Texturation d'une matrice protéique en vue de la conception d'un aliment fonctionnel par impression 3D

Stéphane Portanguen

▶ **To cite this version:**

Stéphane Portanguen. Texturation d'une matrice protéique en vue de la conception d'un aliment fonctionnel par impression 3D. Biotechnologies. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. ⟨NNT : 2023UCFA0143⟩. ⟨tel-04495066v2⟩

HAL Id: tel-04495066

https://theses.hal.science/tel-04495066v2

Submitted on 25 Jul 2024 (v2), last revised 8 Mar 2024 (v3)

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.

HAL Authorization

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Sciences et Technologies de l'Agriculture, de l'Alimentation et de l'Environnement)

Soutenue le 19 décembre 2023 par

Stéphane PORTANGUEN

Texturation d'une matrice protéique en vue de la conception d'un aliment fonctionnel par impression 3D

Directeurs de Thèse : Pierre-Sylvain Mirade & Thierry Astruc

Jury

Président :	Philippe Michaud	Professeur, Université Clermont auvergne, Clermont-Ferrand
Rapporteur(e)s :	Luc Fillaudeau	Directeur de Recherche, INRAE, Toulouse
	Marie de Lamballerie	Professeure, Oniris, Nantes
Examinatrices :	Anne Duconseille	Chargée de Recherche CDD, INRAE, Theix
	Barbara Rega	Professeure, AgroParisTech, Saclay
Membre :	Pierre-Sylvain Mirade	Directeur de Recherche, INRAE, Theix
Membres invités :	Thierry Astruc	Ingénieur de Recherche, INRAE, Theix
	Vincent Meyer	Professeur, Université Côte d'Azur, Nice

Laboratoire d'accueil :

Centre de Recherches INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes, site de Theix
Unité de Recherches 370 - Qualité des Produits Animaux
Équipe Imagerie & Transferts

Remerciements

De nombreuses personnes m'ont soutenu tout au long de ce travail de thèse, de façon pratique, sous la forme de conseils ou tout simplement en étant présentes.

Je commencerais tout d'abord par remercier mes directeurs de thèse Pierre-Sylvain Mirade (directeur de l'unité de recherche Qualité des Produits Animaux) et Thierry Astruc (responsable de l'équipe Imagerie & Transferts) pour m'avoir accordé leur confiance tout au long de ces années et pour m'avoir encouragé à travailler sur un sujet, qui, au début apparaissait comme plutôt « exotique ».

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse et, en particulier Fabrice Audonnet, Laurent Chaunier et Pascal Tournayre qui, malgré leurs emplois du temps plus que chargés, n'ont jamais été avares en bons conseils.

Je remercie également Véronique Santé-Lhoutellier, directrice de l'unité QuaPA lors du démarrage de ma thèse, pour son soutien à ce projet.

Je tiens à sincèrement remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail : Dr Luc Fillaudeau, Pr Marie de Lamballerie, Pr Philippe Michaud, Dr Barbara Rega, Dr Anne Duconseille et Pr Vincent Meyer.

Ce travail de thèse s'étant déroulé dans un environnement de travail que je connais bien (je ne dirais pas depuis combien de temps par coquetterie !), ma crainte est d'oublier de remercier quelqu'un. J'adresse donc mes plus sincères remerciements aux collègues des différentes unités du Centre INRAE Clermont Auvergne Rhône-Alpes que j'ai pu côtoyer tout au long de cette thèse et, à l'ensemble des membres de l'unité QuaPA (et en particulier à Laëtitia, Christophe, Thierry S., Frédéric pour leur aide précieuse !) J'ai bien entendu une pensée toute particulière pour mes collègues de l'équipe Imagerie & Transferts (Pierre-Sylvain, Thierry, Pascal, Jean-Michel, Raphaël, Jason, Maïa, Alain, Coline, Anne, Charles, Annie, Magaly, Christine, Adeline, Arnaud et Saïd). Leur présence, leur soutien et leur aide au quotidien ont énormément comptés pour moi et, ce travail ne serait pas là où il en est sans eux (notamment Pascal, sans qui ce travail aurait été impossible et, qui a dû composer avec certaines de mes idées « bizarres » pour aboutir au développement de notre imprimante 3D…). Le fait de travailler sur l'impression 3D, un procédé novateur, a créé une certaine dynamique voire une émulation qui a permis de fédérer des personnes d'horizons divers autour de ce projet. Ce travail aura été à l'origine de nouvelles collaborations et de riches échanges dans des domaines que je ne connaissais pas ou très mal. J'adresse donc mes remerciements amicaux à toutes les personnes du Centre de Recherches en Odontologie Clinique (CROC) (en particulier Marie-Agnès, Noémie et Nicolas)

et de l'unité TransitionS/IMREDD de l'université Côte d'Azur (merci à Vincent, Jacques, Arnaud et Marie).

J'ai eu la chance, au cours de ce travail, d'encadrer ou de co-encadrer des étudiant(e)s avec de grandes qualités humaines et professionnelles. Je tiens à remercier chaleureusement Nicolas Lebert, Thomas Gameiro, Thomas Brunel, Paul Gibert, Mona Fortune, Selma Leonardi et Charlotte Dumoulin pour le travail accompli (désolé Charlotte pour les maux de tête que ton sujet t'a procuré !!). Je n'oublie pas non plus Antoine Boyer qui a beaucoup travaillé à la mise en place d'une solution de post-traitement dans l'imprimante 3D, en parallèle de ce travail de thèse.

J'ai eu la chance, tout au long de ma carrière, d'avoir pu bénéficier d'un environnement de travail exceptionnel, qui m'a permis d'évoluer depuis mon poste de technicien de la recherche, jusqu'à soutenir cette thèse de doctorat. Cette évolution s'est construite avec le temps, mais elle a surtout été possible grâce à plusieurs personnes qui ont beaucoup comptées dans ma carrière et qui m'ont toujours encouragées à aller plus loin tout en me guidant dans mes choix. Certaines d'entre elles sont toujours là quand d'autres profitent désormais d'une retraite bien méritée, mais je n'ai pas oublié ce qu'elles m'ont apportées au fil de toutes ces années. Je tiens donc à exprimer tout ma reconnaissance, une reconnaissance qui va bien au-delà du cadre de cette thèse à : André et Isabelle Lebert, Alain Kondjoyan, Jean-Dominique Daudin, Pierre-Sylvain Mirade et Thierry Astruc.

Enfin, je voudrais remercier l'ensemble de ma famille, de ma belle-famille et de mes amis proches, mes parents pour avoir toujours été là et, bien sûr, Carine, Lana & Mila pour leur soutien quotidien… et, auprès desquelles je profite de m'excuser pour avoir passé autant de soirées et de weekends à travailler !

Stéphane P.

Merci !

Carine
Lana
Mila

A mon grand-père Jean,

Ce qui est admirable, ce n'est pas que le champ des étoiles soit si vaste, c'est que l'homme l'ait mesuré.

Anatole France (1844-1924)

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte démographique mondial en évolution. En effet, des solutions nutritionnelles sont à développer pour pallier au vieillissement de la population, dont une conséquence est le nombre croissant de personnes présentant des déficiences masticatoires. La texturation d'aliments, riches en protéines de bonne qualité nutritionnelle, est un point essentiel pour une bonne mastication et pour une assimilation optimale des nutriments, mais également pour l'acte et le plaisir de manger.

L'impression 3D alimentaire est une des voies de recherche possibles pour concevoir de nouveaux aliments fonctionnels à destination des personnes fragiles. Afin de correspondre aux problématiques sociétales actuelles, ces aliments doivent être sains, personnalisés et socialement acceptables. Pour répondre à ce cahier des charges ambitieux, une approche en quatre étapes a été utilisée dans ce travail de thèse :

1) Le développement d'une imprimante 3D parfaitement adaptée à la mise en œuvre de matrices carnées. La maîtrise des paramètres d'impression permet désormais de proscrire l'utilisation d'agents de texture et donc, de concevoir des aliments dont la formulation est plus simple et plus naturelle ;
2) Afin de potentialiser la structure des aliments imprimés et d'élargir la gamme des textures possibles, la réaction de glycation a été étudiée et appliquée à un milieu modèle à base de gélatine. Cette matière première a révélé toute sa complexité lors de la mise en œuvre de la réaction, nécessitant une étude d'élucidation des mécanismes mis en jeu. Ainsi, il a été montré que la teneur en eau initiale et l'indice Bloom de la gélatine, en influençant de façon notable la structure secondaire de la gélatine, conditionnaient fortement le devenir de la réaction de glycation ;
3) Les personnes présentant une déficience masticatoire peuvent également souffrir d'un déficit de salivation. Cette troisième partie du travail de thèse a donc consisté à étudier les propriétés rhéologiques de matrices riches en protéines animales, mais aussi la façon d'incorporer un substitut salivaire naturel directement dans l'aliment pour optimiser les propriétés d'extrusion des matrices. Cet aliment fonctionnel, à base de protéines et de mucilage de graines de lin, permettra de lubrifier la cavité buccale et donc, de réduire les douleurs et les risques de fausses routes lors de la mastication et de l'ingestion par des personnes souffrant de xérostomie, d'hyposialie et de dysphagie ;
4) Le couplage de la conception d'un nouvel aliment fonctionnel et d'un procédé de rupture tel que l'impression 3D peut engendrer un phénomène de néophobie, voire de rejet, de la part des consommateurs. La quatrième partie de ce travail s'est attachée à initier une approche sociologique visant à évaluer l'acceptabilité sociale de ce nouveau procédé, sur la base de nouvelles collaborations entre les Sciences du Vivant et les Sciences Humaines & Sociales.

Les prochains travaux vont consister déterminer le mode de post-traitement le plus adapté au respect des propriétés de l'aliment, à en caractériser les propriétés nutritionnelles et, à définir et à appliquer les méthodes nécessaires pour assurer les qualités sanitaires et organoleptiques des aliments fonctionnels.

Mots clés : Impression 3D alimentaire, gélatine, mucilage, nutrition personnalisée, aliment fonctionnel.

Abstract

This thesis is part of a rapidly changing of worldwide demographic context. Indeed, nutritional solutions need to be developed to offset the ageing of the population, one of the consequences of which is the growing number of people with masticatory deficiencies. The texturing of foods, rich in proteins of good nutritional quality, is essential for good mastication and optimal assimilation of nutrients, but also for the act and pleasure of eating.

3D food printing is one of the possible research ways for designing new functional foods for frail people. To meet current societal challenges, these foods need to be healthy, personalized and socially acceptable. To meet these ambitious specifications, a four-stage approach was used in this thesis work:

1) The development of a 3D printer perfectly suited to the use of meat matrices. By controlling the printing parameters, we can now avoid the use of texturizing agents, enabling us to design foods with simpler and more natural formulations;
2) In order to potentiate the structure of printed foods and extend the range of possible textures, the glycation reaction was studied and applied to a gelatin-based model medium. This raw material revealed all its complexity when the reaction was implemented, necessitating a study to elucidate the mechanisms involved. It was shown that the initial water content and Bloom index of the gelatin, by significantly influencing the secondary structure of the gelatin, strongly conditioned the fate of the glycation reaction;
3) People with masticatory deficiencies may also suffer from salivary deficiencies. This third part of the thesis therefore involved studying the rheological properties of matrices rich in animal proteins, as well as how to incorporate a natural saliva substitute directly into the food in order to optimize the extrusion properties of the matrices. This functional food, based on flax protein and mucilage, will lubricate the oral cavity, reducing pain and the risk of wrong way during chewing and swallowing in people suffering from xerostomia, hyposialia and dysphagia;
4) Coupling the design of a new functional food with a disruptive process such as 3D printing can lead to neophobia, or even rejection, on the part of consumers. The fourth part of this work aims to initiate a sociological approach designed to assess the social acceptability of this new process, drawing on new collaborations between the Life Sciences and the Humanities and Social Sciences.

Future work will focus on determining the post-processing method best suited to respecting the food's properties, characterizing its nutritional properties, and defining and applying the methods needed to guarantee the sanitary and organoleptic qualities of functional foods.

Keywords: 3D food printing, gelatin, mucilage, personalized nutrition, functional food.

Table des matières

Remerciements **1**

Résumé **6**

Abstract **7**

Listes des abréviations **14**

Nomenclature **16**

Listes des figures **17**

Listes des tableaux **27**

Liste des annexes **30**

Introduction **31**

Chapitre 0 : Revue de littérature de l'impression 3D (ou fabrication additive) à l'impression 3D alimentaire **39**

0.1. Généralités sur l'impression 3D 40

0.2. L'impression 3D, une technologie émergente et adaptable pour la conception et la fabrication d'aliments 43

0.3. L'impression 3D alimentaire 45

0.4. Impact du procédé d'impression sur les aliments 51

0.4.1. Les aliments d'origine végétale 51

0.4.2. Les aliments d'origine animale 53

0.1.1.1. Les produits carnés 54

0.1.1.2. Les produits laitiers 57

0.1.1.3. Les ovoproduits 58

0.5. Impact du procédé d'impression sur les macromolécules de l'aliment 60

0.5.1. Impact sur les protéines 60

0.5.2. Impact sur les lipides 62

0.5.3. Impact sur les glucides 64

0.6. La problématique du post-traitement en impression 3D alimentaire 66

0.7. Impression 3D alimentaire et durabilité 72

0.8. Les principales perspectives en matière d'impression 3D alimentaire 74

Chapitre 1 : Développement d'une imprimante 3D alimentaire et optimisation du procédé d'impression pour la fabrication d'aliments fonctionnels carnés **79**

1.1. Problématique 80

1.2. Matériels et méthodes 81

1.2.1. Les gels protéiques 81

1.2.2. La conception assistée par ordinateur 81

1.2.3. Les logiciels et outils de développement utilisés 82
1.2.4. Les méthodes analytiques 84
1.2.5. Les imprimantes 3D 84
1.2.5.1. Imprimantes 3D polymères 85
1.2.5.2. Imprimante 3D métal 86
1.3. Méthode de conception et résultats 93
1.3.1. Conception du premier prototype d'imprimante 3D alimentaire 93
1.3.2. Conception du second prototype d'imprimante 3D alimentaire 96
1.3.2.1. Modifications apportées à la tête d'impression 97
1.3.2.1.1. Intégration physique du système d'extrusion 98
1.3.2.1.2. Conception de nouvelles buses métalliques 100
1.3.2.2. Modifications apportées au plateau d'impression 103
1.3.2.2.1. Intégration et contrôle du module à effet Peltier 103
1.3.2.2.2. Conception de la barrière optique 104
1.3.2.2.3. Etalonnage du plateau d'impression 106
1.3.2.3. Modifications électroniques et communication au sein de l'imprimante 107
1.3.2.3.1. Communication avec la carte mère 108
1.3.2.3.2. Communication avec l'écran et le lecteur de carte SD 109
1.3.2.3.3. Conception du circuit imprimé 110
1.3.2.3.4. Interface Homme-machine 111
1.3.2.3.5. Pilotage et contrôle du doseur volumétrique 113
1.3.3. Validation du second prototype d'imprimante 3D alimentaire 116
1.3.3.1. Validation et caractérisation de la régulation thermique 116
1.3.3.1.1. Effet de la régulation thermique de la tête d'impression sur le débit d'extrusion 116
1.3.3.1.2. Evaluation de la régulation de température du module à effet Peltier 119
1.3.3.1.3. Effet du procédé sur la répétabilité de l'impression de gels protéiques 122
1.3.3.1.4. Effet du gradient thermique lié au plateau d'impression sur l'impression de gels protéiques . 124
1.3.4. Amélioration du système de refroidissement en cours d'impression....125
1.3.5. Faisabilité d'un système de post-traitement *in situ* par convection à air chaud 127
Chapitre 2 : La glycation, une alternative pour la texturation d'aliments fonctionnels ? - Etude des mécanismes sur un milieu modèle à base de gélatine 133
2.1. Etat de l'art sur la réaction de glycation....135
2.1.1. Les mécanismes et paramètres de la réaction de glycation....135
2.1.2. L'intérêt d'utiliser la réaction de glycation dans des matrices alimentaires....143
2.1.3. Les produits de glycation avancés 147
2.1.3.1. Relation entre les produits de glycation avancés et la santé humaine 147
2.1.3.2. Les paramètres pour limiter la présence des produits avancés de glycation dans les aliments... 150
2.1.4. Application de la réaction de glycation à une matrice alimentaire - Effets de la matière première et des conditions opératoires....152

2.1.4.1. La gélatine 152
2.1.4.2. Réaction de glycation au sein de la gélatine 156
2.1.5. Modélisation de la réaction de glycation et processus d'impression 3D pour les aliments personnalisés texturés 158
2.1.6. Les méthodes d'étude et de suivi de la réaction de glycation 159
2.1.6.1. Dosage des glucides réducteurs 160
2.1.6.2. Méthodes colorimétriques 161
2.1.6.3. Méthode par fluorescence 162
2.1.6.4. Profil de texture et rhéologie 162
2.1.6.5. Analyses microscopiques 164
2.1.6.6. Densitométrie 166
2.1.6.7. Spectrométrie de masse 167
2.1.6.8. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) 168
2.2. Matériels et méthodes 171
2.2.1. Liste des différents matériels et réactifs utilisés 171
2.2.2. Détermination des paramètres réactionnels à partir d'études préliminaires 175
2.2.2.1. Préparation des gels de gélatine pour la détermination des paramètres réactionnels 176
2.2.2.2. Evaluation des effets de la glycation par mesure de la texture 177
2.2.2.3. Etat d'avancement de la réaction de glycation par spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible 178
2.2.2.4. Mise en évidence de la formation de bases de Schiff par approche protéomique 179
2.2.2.4.1. Hydrolyse enzymatique des gels de gélatine 179
2.2.2.4.2. Analyses par spectrométrie de masse Maldi-TOF/MS 180
2.2.2.4.3. Analyses par LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry) ... 181
2.2.3. Etude des mécanismes de la glycation dans un gel de gélatine 182
2.2.3.1. Préparation des échantillons et design expérimental 182
2.2.3.2. Méthodes utilisées pour la caractérisation de la glycation 183
2.2.3.2.1. Colorimétrie 183
2.2.3.2.2. Caractérisation ultra-structurale par microscopie électronique à transmission 184
2.2.3.2.3. Analyse de la composition chimique et de la structure macromoléculaire des protéines 184
2.2.3.2.4. Comportement rhéologique 185
2.2.4. Analyses statistiques 186
2.3. Résultats et discussions 186
2.3.1. Mise au point des gels de gélatine et détermination des paramètres réactionnels au cours des études préliminaires 186
2.3.1.1. Choix de l'ose réducteur 186
2.3.1.2. Méthodes d'évaluation de l'effet de la glycation sur un gel de gélatine 187
2.3.1.2.1. Mise au point et répétabilité des mesures de pénétrométrie 187
2.3.1.2.2. Mesures au spectrophotomètre d'absorption moléculaire UV-visible 189
2.3.1.3. Choix des paramètres réactionnels (pH, température et concentration en *D*-ribose) de la glycation

192

2.3.2. Caractérisation de l'effet de la réaction de glycation et des conditions réactionnelles sur la structure de la gélatine par une approche multidisciplinaire 196

2.3.2.1. Approche colorimétrique 196

2.3.2.2. Approche protéomique 197

2.3.2.2.1. Hydrolyse enzymatique 197

2.3.2.2.2. Analyse par Maldi-TOF/TOF 198

2.3.2.2.3. Analyse par LC-MS/MS 200

2.3.2.3. Caractérisation ultra-structurale 203

2.3.2.4. Analyse de la structure chimique par spectroscopie FT-IR 205

2.3.2.4.1. Identification des bandes spectrales d'intérêt 205

2.3.2.4.2. Effets des conditions expérimentales sur la bande d'absorbance attribuée aux glucides 209

2.3.2.4.3. Effets des conditions expérimentales sur les bandes d'absorbance attribuées aux protéines . 212

2.3.2.5. Etude des propriétés texturales 222

2.3.2.6. Analyse du comportement rhéologique 224

2.4. Conclusions et perspectives 231

Chapitre 3 : Caractérisation rhéologique de formulations en vue de la conception par impression 3D d'un aliment fonctionnel riche en protéines 234

3.1. Etat de l'art 235

3.1.1. Mécanismes de la mastication et adaptation de l'alimentation 237

3.1.1.1. Effet du vieillissement sur la mastication 238

3.1.1.2. Effet de la perte de dents et des facteurs liés à l'âge sur les fonctions buccales 239

3.1.1.3. Conséquences des carences bucco-dentaires sur la nutrition des personnes âgées 240

3.1.2. Les aliments fonctionnels 241

3.1.2.1. Aliments fonctionnels et formulation 243

3.1.2.2. Aliments fonctionnels et impression 3D 244

3.1.3. Une nouvelle approche pour un aliment fonctionnel : les substituts salivaires 248

3.1.4. Les mucilages 250

3.1.5. Modélisation des conditions du processus d'impression et de leur relation avec les propriétés structurelles 253

3.1.6. Rhéologie appliquée aux aliments fonctionnels 254

3.1.6.1. Définitions 254

3.1.6.2. Applications de la rhéologie aux aliments fonctionnels imprimés en 3D 263

3.2. Matériels et méthodes 265

3.2.1. Conception d'un prototype de simulation d'extrusion 265

3.2.1.1. Corps de l'extrudeur 266

3.2.1.2. Buse d'extrusion 267

3.2.1.3. Adaptation du dispositif sur le texturomètre 269

3.2.1.4. Détermination des conditions d'extrusion 270

3.2.2. Préparation des ingrédients 272

3.2.2.1. La viande ... 272
3.2.2.2. Le mucilage ... 273
3.2.2.3. Les différentes formulations ... 273
3.2.3. Mesures rhéologiques ... 275
3.2.3.1. Les géométries utilisées ... 275
3.2.3.2. Les méthodes utilisées et les paramètres mesurés ... 277
3.2.4. Analyses statistiques ... 279
3.3. Résultats et discussions ... 279
3.3.1. Comportement rhéologique des matières premières ... 279
3.3.1.1. Le mucilage ... 279
3.3.1.2. Les préparations à base de viande ... 285
3.3.1.2.1. Mesures rotationnelles – Viscosité apparente ... 285
3.3.1.2.2. Paramètres extraits des mesures oscillatoires ... 287
3.3.1.2.2.1. Evaluation de la stabilité structurelle des matrices ... 288
3.3.1.2.2.2. Evaluation de la résistance à la déstructuration ... 292
3.3.1.2.2.3. Evaluation de la vitesse de déstructuration ... 294
3.3.1.2.2.4. Evaluation de la difficulté d'extrusion ... 295
3.3.1.2.2.5. Evaluation de la force du réseau – élasticité ... 296
3.3.1.2.2.6. Evaluation de la cohésion des matrices ... 299
3.3.1.2.2.7. Evaluation de la limitation de l'écoulement avant impression ... 300
3.3.1.2.2.8. Comportement d'amincissement par cisaillement ... 301
3.3.1.2.2.9. Effet de la température sur les modules de conservation de perte (G' et G'') ... 304
3.3.2. Effets de l'extrusion sur les formulations à base de viande sélectionnées ... 310
3.3.2.1. La viscosité apparente ... 311
3.3.2.2. La viscosité complexe ... 315
3.3.2.3. Balayage en fréquence ... 317
3.4. Conclusion ... 318

Chapitre 4 : Une nouvelle approche pour évaluer l'acceptabilité sociale d'une nouvelle technologie et de nouveaux aliments : L'association des « Sciences du Vivant » et des « Sciences Humaines & sociales » ... 321

4.1. Introduction ... 322
4.1.1. Faire accepter une technologie ou un aliment innovant, où en sommes-nous ? ... 323
4.1.2. L'aliment fonctionnel, une vraie plus-value en termes d'acceptabilité ? ... 326
4.2. Les méthodes de travail ... 328
4.3. Résultats obtenus ... 329
4.3.1. Journées portes ouvertes Centre INRAE – Mai 2019 ... 329
4.3.2. Semaine de la dénutrition – Novembre 2022 ... 334
4.3.3. Salon International de l'Agriculture – Février 2023 ... 335

4.3.4. Association les « Gourmets Curieux » - Avril 2023 337
4.4. Perspectives de travail – le projet SAMASTIC 340
4.4.1. Les questions scientifiques 340
4.4.2. La méthode de travail 341
4.4.3. Sorties envisagées et conclusion 342
Conclusion générale et perspectives 344
Références bibliographiques 349
Annexes 369

Listes des abréviations

ACV - Analyse de Cycle de Vie

ACP - Analyse en Composante Principale

ADIV - Association pour le Développement de l'Institut de la Viande

AGE - Advanced Glycation End-products

AGE HMW - AGE alimentaire de poids moléculaire élevé

AGE LMW - AGE alimentaire de faible poids moléculaire

AGER1 - Advanced Glycated End-product Receptor 1

ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ANOVA - Analyse de variance

ANS - Action Nouvelle Soutenue

APREH - l'association pour la réadaptation et l'épanouissement des personnes handicapées

ASCII - American Standard Code for Information Interchange

a_w - activité de l'eau

BMD - Bound Metal Deposition

BSA - Albumine de Sérum Bovin

$CaCl_2$ - Chlorure de Calcium

CAO - Conception Assistée par Ordinateur

CHU – Centre Hospitalier Universitaire

CICS - Centre d'Imagerie Cellulaire Santé

CLIP - Continuous Liquid Interface Production

CML : CarboxyMéthyl Lysine

CNC - Computer Numerical Control

CPER : Contrat de Plan Etat-Région

DDT - Dichloro Diphényl Trichloroéthane

DED - Directed energy deposition

DIRV - Déclaration d'Invention et de Résultats Valorisables

DIW - Direct Ink Writing

DLP - Digital Light Processing

DLS - Digital Light Synthesis

DMLS - Direct Metal Laser Sintering

EDTA - Ethylène Diamine Tétra Acétique

EHPAD - Etablissements d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes

EMSC - Extended Multiplicative Signal Correction

FDA - Food and Drug Administration

FDM - Fused Deposition Modeling

FFF - Fused Filament Fabrication

FOP - Food Oral Processing

FT-IR - spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier

FUFOSE - European Comission Concerted Action on Functional Food Science

G6P - Glucose-6-Phosphate

Glyc'3D - Investigation de la réaction de glycation sur la texturation de produits alimentaires fabriqués par impression 3D

HCCA - Acide trifluoroacétique et acide α-cyano-4-hydroxycinnamique

HACCP – Hazard Analysis Critical Point

HMF - HydroxyMéthylFurfural

HPLC - Chromatographie Liquide Haute Performance

I3D - Impression 3D

IAO - Ingénierie Assistée par Ordinateur

IF - Impact Factor

ILSI - The International Life Sciences Institute (Europe)

INRAE – Institut National de la Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement

IMREDD - Institut méditerranéen du risque de l'environnement et du développement durable

IR - Infra Rouge

ISO - Organisation Internationale de Normalisation

LCD - Liquid Crystal Display

LC-MS/MS - Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LMGE-UCA - Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement – Université Clermont Auvergne

LVR - Région Viscoélastique Linéaire MEB : Microscope Electronique à Balayage

Maldi-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight

MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute

MET - Microscopie Electronique à Transmission

MG - Matière Grasse

MIM - Metal Injection Molding

MISO - Master In Slave Out

MOSI - Master Out Slave In

MS - Spectroscopie de Masse

MS - Matière Sèche

NaCl - Chlorure de sodium

OMS/WHO - Organisation Mondiale de la Santé

ONIRIS - Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique

PDCA - Protein Digestibility Corrected Amino Acid

PETG - PolyEthylène Téréphtalate modifié au Glycol

PFF - Peptide Fragment Fingerprint

pH - Potentiel d'hydrogène

PID - Proportionnel, Intégral, Dérivé

PLA - Acide PolyLactique

POM - Point d'Origine Machine

PTFE - Tétrafluoroéthylène (Téflon®)

RAGE - Receptor for Advanced Glycation End-products

SA - Acide Sinaptique

SAMASTIC - Coupler Sciences des Aliments, MAstication et Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication

SCK - Serial Clock

SD - Secure Digital

SDS - Dodécyl Sulfate de Sodium

SDS-PAGE - Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SEM - Erreur Standard à la Moyenne

SGC - Solid Ground Curing

SHS - Selective Heat Sintering

SLA - Stereo Lithography Apparatus

SLS - Selectif Laser Sintering

SIA - Salon International de l'Agriculture

SOLEIL - Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE

SPI - Serial Peripheral Interface

SS - Slave Select

TFA - Acide TrifluoroAcétique

TPA - Texture Profile Analysis

Tris - TRISaminométhane (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol)

Transform (INRAE) - Aliments, produits biosourcés et déchets

UAM - Ultrasonic additive manufacturing

UART - Universal Asynchronous Receiver-Transmitter

UC - Ultrasonic Consolidation

UMR - Unité Mixte de Recherche

UMR Medis (INRAE) - Unité Mixte de Recherche Microbiologie, Environnement Digestif, Santé

UMR UNH - Unité de Nutrition Humaine

UR QuaPA - Unité de Recherche Qualité des Produits Animaux

USC CROC - Unité Sous Contrat Centre de Recherche en Odontologie Clinique

UTC - Université de Technologie de Compiègne

UV - Ultra-Violet

Wav - Wave Applied Voxe

Nomenclature

a* - Indice de rouge (sans unité)

b* - Indice de jaune (sans unité)

Débit d'air – $m^3.min^{-1}$

Débit d'extrusion – mm^3 ou mL ou $cm^3.s^{-1}$

L* - Luminance (sans unité)

F – Force (N)

G – Module de cisaillement

G* - Module complexe

G' – Module de conservation (Pa).

G'max – Valeur maximale d u module de conservation (Pa)

G'' – Module de perte (Pa)

P – Pression (Pa)

Poussée – $Pa.s^{-2}$

Puissance électrique consommée – kWh ou kWh/kg

Qs – Quantité de solvant (g)**tanδ** – Facteur d'amortissement (sans unité)

Vitesse d'impression/déplacement – $mm.s^{-1}$

X – Teneur en eau (kg_{eau}/kg_{MS})

ɣ - Déformation de cisaillement

$\dot{\gamma}$ - Taux de cisaillement ou gradient de vitesse (s^{-1})

γ_0 – Amplitude de déformation

ΔE* – Différence de couleur totale (sans unité)

δ - Déphasage

η – Viscosité (Pa.s)

η* - Viscosité complexe (Pa.s)

λ – Absorbance (sans unité)

λ – Conductivité thermique ($W.m^{-1}.K^{-1}$)

τ – Contrainte de cisaillement (Pa)

τ-fin-LVR – Fin de la région viscoélastique linéaire (Pa)

$\bar{\nu}$ - Nombre d'onde (cm^{-1})

ω – Fréquence angulaire ($rad.s^{-1}$)

Listes des figures

Figure A. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'une imprimante 3D à dépôt de fil fondu (exemple d'un matériau polymère) (D'après myago3d.fr).....33
Figure B. Évolution temporelle du nombre d'articles (incluant les articles de synthèse, les articles de recherche, les chapitres d'ouvrage, les communications courtes, les résumés de conférences...) publiés depuis l'émergence de la technologie d'impression 3D. Les chiffres ont été obtenus à partir de requêtes effectuées sur la plateforme ScienceDirect, en recherchant les expressions suivantes : "additive manufacturing" ou "3D printing" ou "3D food printing" dans les titres, les résumés et les mots-clés des articles en question (*: Les chiffres pour l'année 2023 ne sont que partiels, car établis au 22/09). 34
Figure C. Description schématique des problématiques autour de l'I3D alimentaire (Portanguen, Tournayre, Sicard, Astruc & Mirade, 2022).....35
Figure D. Schématisation des mécanismes de la glycation dans des films à base d'isolats de protéines de cacahuète et de xylose (d'après (Liu et al., 2017).....37
Figure E. Représentation schématique de la démarche de recherche mise en œuvre dans ce travail de thèse. 38

Figure 0.1. Les 5 étapes inhérentes au procédé d'impression 3D alimentaire.....44
Figure 0.2. Les principales techniques d'impression 3D applicables aux matériaux biologiques : A – Extrusion ; B – Dépôt de gouttelettes ou jet de matériau ; et C – Impression assistée par laser (d'après Portanguen et al., 2019).....46
Figure 0.3. Exemple d'une imprimante alimentaire 3D commerciale, la « Foodini » (Natural Machines, Espagne) : à gauche, une vue générale de la machine ; à droite, un exemple d'impression d'aliments (purée de légumineuses).....47
Figure 0.4. Effet de l'ajout d'amidon sur l'imprimabilité de purée de pomme de terre (d'après Liu et al., 2018). 53
Figure 0.5. Modèles de viande composite multicouche imprimés en 3D : A - échantillons cru (à gauche) et cuit (à droite) ; B - Dépôt de filament d'une formulation à base de viande et de matière grasse selon trois taux de remplissage, réalisé avec des buses de diamètre 2 mm pour la viande et de 1 mm pour la matière grasse (d'après Dick et al., 2019b). 54
Figure 0.6. Effet de l'ajout de sel sur l'imprimabilité d'une pâte de surimi : A – aucun ajout ; B – ajout de 0,5 g NaCl/100 g de surimi ; C – ajout de 1,0 g de NaCl/100 g de surimi ; et D – ajout de 1,5 g de NaCl/100 g de surimi (d'après Wang et al., 2018). 61
Figure 0.7. Evolution envisagée, à court et moyen terme, de l'I3D alimentaire dans l'optique de concevoir de nouveaux aliments à base de protéines (d'après Portanguen et al., 2019). 65
Figure 0.8. Allure d'une onde gaussienne : répartition de l'éclairement d'un faisceau laser dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation (http://www.optique-ingenieur.org/fr/cours).....70
Figure 0.9. Problématique de l'impression 3D d'aliments.....78

Figure 1.1. Couverture de la revue internationale Foods, dont l'illustration correspond à un schéma inspiré par l'article Portanguen et al. (2022), publié dans ce numéro. 80
Figure 1.2. Différentes imprimantes polymères du laboratoire utilisées dans ce travail : A – Volumic Stream 30 Pro et, B – Makerbot Method X. 85
Figure 1.3. Images des deux imprimantes 3D achetées en kit dans le commerce et qui ont été utilisées pour concevoir au laboratoire deux prototypes d'imprimantes 3D alimentaires : A – Imprimante Prusa i3 ; B – Imprimante Ghost, dans leur configuration d'origine. 86
Figure 1.4. Processus de conception, de fabrication et post-traitement d'une pièce métallique (acier inoxydable 316L) par impression 3D, selon la méthode BMD – Exemple de l'équipement Studio System+ (DeskTop Metal™) acheté au laboratoire. 87
Figure 1.5. Système d'impression 3D métal basé sur la technologie Bound Metal Deposition : A – Illustration

du système de chauffage du four de frittage ; les pièces à traiter sont placées au sein d'un boîtier en graphite entouré de résistance chauffantes ; B – Cycle de température au cours de l'étape de frittage.90

Figure 1.6. Exemple de déformations possibles au cours de l'étape de frittage, la géométrie et la position des supports doivent être optimisées en amont. 91

Figure 1.7. Exemple de pièce ayant subi de fortes contraintes thermiques lors de l'étape de frittage, à cause d'un défaut de conception. 91

Figure 1.8. Aspect de surface de pièces métalliques imprimées avec et sans post-traitement (post-traitement léger par tribofinition, uniquement). Grossissement x2. 92

Figure 1.9. Vue de la tête d'impression conçue pour l'extrusion de gels protéiques et installée sur le premier prototype d'imprimante alimentaire, développé à partir d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). 94

Figure 1.10. Plans de conception de la tête d'impression développée et adaptée sur une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). A – Support global ; B – Dispositif porte-seringue ; C – Vis sans fin et pignon de transmission ; D – Support du capteur de position selon l'axe z. 94

Figure 1.11. Exemples de gels imprimés avec le premier prototype d'imprimante 3D alimentaire, conçu au laboratoire, sur la base d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). A – gel ne contenant pas d'alginates, B et C – gels contenant des alginates. 96

Figure 1.12. Vues des principales modifications apportées (tête et plateau d'impression) à l'imprimante 3D Ghost achetée dans le commerce (à comparer avec la Figure 1.3a) pour le développement du second prototype d'imprimante 3D alimentaire. 97

Figure 1.13. Le système Precifluid®. A – Vue extérieure et, B – Principales caractéristiques du système Precifluid® utilisé pour déposer le matériau alimentaire sur le plateau d'impression du second prototype d'imprimante développé au laboratoire. 98

Figure 1.14. Vues détaillées du manchon conducteur en aluminium et du collier chauffant qui ont été installés sur le second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire. 99

Figure 1.15. Modélisation par CAO du support d'extrudeur comprenant deux emplacements possibles, destinés à recevoir deux têtes d'impression, en vue de réaliser une impression bi-composants. 100

Figure 1.16. Conception et fabrication de buses d'extrusion métalliques. A – Exemple de buse en plastique du commerce ; B – Buse modélisée par CAO, et C – résultats d'impression de buses au moyen de l'imprimante 3D métal. 101

Figure 1.17. Vue en coupe de buses modélisées par CAO : A – buse d'extrusion, dont la paroi a une épaisseur de 0,25 mm ; et B – buse d'extrusion, dont la paroi a été renforcée à 1 mm d'épaisseur, de façon à éviter toute déformation lors de l'impression 3D métal. 102

Figure 1.18. Mesure, au moyen d'un stéréomicroscope, du diamètre de buses d'extrusion imprimées en inox 316L. Les écarts mesurés entre les cotes du modèle CAO et les mesures expérimentales sont indiqués. A – buse avec une paroi de 0,25 mm d'épaisseur ; B – buse avec une paroi renforcée de 1 mm d'épaisseur. 102

Figure 1.19. Détails du système de plateau d'impression refroidi, spécialement conçu pour le second prototype d'imprimante 3D alimentaire développée au laboratoire. A – Vue en coupe du projet de plateau d'impression refroidi ; B – Vue du plan de conception et, C – Vue du dispositif fixé sur le plateau de l'imprimante. 104

Figure 1.20. Barrière optique permettant la purge automatique du Precifluid®. A – représentation schématique du fonctionnement de la barrière optique, B – plan de conception et, C – la barrière optique imprimée en 3D. 106

Figure 1.21. Représentation schématique des différents organes ajoutés lors du développement du second prototype d'imprimante 3D alimentaire et, de leurs liens avec le bloc électronique. 1) Carte électronique ; 2) Circuit imprimé (interfaçage de la carte électronique) ; 3) Lecteur de carte SD pour la gestion de l'interface « Homme-machine » ; 4) Ecran tactile LCD ; 5) Barrière optique pour la purge du doseur volumétrique ; 6) Doseur volumétrique Precifluid® ; 7) Plateau refroidissant par système à effet Peltier ; 8) Interface « Homme-machine » ; 9) Carte mère d'origine de l'imprimante. 107

Figure 1.22. Représentation schématique d'une de liaison de type UART (Universal Asynchronous Receiver-Transmitter) entre deux appareils. 108

Figure 1.23. Représentation schématique d'une liaison de type SPI (Serial Peripheral Interface) entre un appareil maître et 3 appareils esclaves. 110
Figure 1.24. Typon du circuit imprimé. A – Connexion automatique des éléments à partir du schéma de câblage. B – Placement manuel des connexions des éléments. 111
Figure 1.25. Captures d'écrans des différents menus développés pour le pilotage du second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire. 1) Indicateur de volume d'échantillon dans la seringue ; 2) Choix des menus ; 3) Etat de la tête d'impression et du plateau ; 4) Température du plateau en temps réel ; 5) Choix de la température de consigne du plateau ; 6) Pilotage manuel des moteurs ; 7) Commande d'extrusion manuelle ; 8) Programmation du diamètre de la buse ; 9) Retour en butée du piston du Precifluid®. 113
Figure 1.26. Schématisation du fonctionnement et du câblage du boîtier de contrôle du doseur volumétrique Precifluid®....114
Figure 1.27. A – Schéma de fonctionnement de la butée et, B – Butées physique du doseur volumétrique Precifluid® (entourée en rouge). 114
Figure 1.28. Schéma de câblage du circuit pilote du moteur pas-à-pas mis en place pour contrôler l'action du doseur volumétrique Precifluid®....115
Figure 1.29. Visualisation, par imagerie infrarouge, du transfert de chaleur qui a lieu entre le collier chauffant et le doseur volumétrique Precifluid®....117
Figure 1.30. Effet de la température de régulation de l'extrudeur sur le volume d'eau récupéré suite à l'extrusion. Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM. 118
Figure 1.31. Effet du débit d'extrusion sur la géométrie de gels de gélatine imprimés, sachant que l'objectif était d'obtenir un cylindre de 20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur. 119
Figure 1.32. Evaluation de la régulation de la température du module à effet Peltier placé sous le plateau d'impression du second prototype d'imprimante développé au laboratoire : A – Stabilité de la régulation du module à effet Peltier pour une consigne fixée à 4 °C et à 10 °C (les barres d'erreur correspondent à la SEM) ; B – Classement par occurrence de la valeur absolue de la différence entre la température mesurée et la température de consigne. 120
Figure 1.33. Evaluation de la réponse de la régulation thermique du module à effet Peltier suite au dépôt de matière chaude : A – Dépôt d'un cylindre de gélatine préalablement chauffé à 30 °C ; B – Dépôt d'une plaque d'aluminium de 2 mm d'épaisseur, de surface égale à celle de la plaque d'impression (16 cm^2) et préalablement chauffée à 30 °C. Le courbes moyennes sont obtenues à partir de 3 répétitions (barres d'erreur = SEM). 122
Figure 1.34. Evaluation de la fermeté de 5 gels de gélatine imprimés, à l'aide du test de Texture Profile Analysis (TPA). La ligne horizontale (en noir) représente la moyenne des forces maximales pour les 5 échantillons et, pour les deux compressions successives. Les SEM sont représentés par les lignes horizontales gris clair et gris foncé.....123
Figure 1.35. Effet de la température du plateau d'impression (10 et 24 °C) sur la géométrie de cylindres de gel de gélatine de 20 mm de diamètre et de 5 mm de hauteur. 124
Figure 1.36. Visualisation de l'effet du gradient thermique lié au plateau d'impression sur la géométrie des gels de gélatine imprimés : A – Déformation de la structure en partie haute du gel dû à un défaut de refroidissement ; B – Contrôle de l'épaisseur des couches déposées. La géométrie des gels imprimés en 3D a été vérifiée à l'aide d'un stéréo-microscope (**Tableau 1.1**) équipé d'une caméra numérique couleur de 5,9 M pixels. 125
Figure 1.37. Schéma de principe du système de refroidissement additionnel par air comprimé, installé pour permettre au produit imprimé de conserver sa forme, au fur et à mesure de l'impression. 126
Figure 1.38. Intégration du dispositif de refroidissement additionnel par air comprimé à la tête d'impression du second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire.....126
Figure 1.39. Images des gels de gélatine imprimés et refroidis : A – seulement, par le plateau d'impression ; et B - en associant avec un jet d'air comprimé à 0,4 MPa. 127
Figure 1.40. Vues détaillées de l'échangeur thermique conçu pour chauffer l'air en vue de procéder à une cuisson de l'aliment en cours d'impression : A – Vue générale de la modélisation CAO ; B – Vue selon une coupe transversale de l'échangeur ; C – Vue selon une coupe longitudinale de l'échangeur : D – Vue

modélisée de la spirale interne dans laquelle l'air circule ; E – Vue extérieure du système en cuivre après impression ; F – Installation du dispositif pour la mesure des températures et des vitesses d'air (isolant retiré pour la prise de la photographie). 129

Figure 1.41. A – Modélisation de la section autoportante de la spirale interne de l'échangeur. B – Motif de remplissage interne et épaisseur de paroi du bloc de cuivre. 130

Figure 1.42. Evolution de la qualité d'impression de gels de gélatine en fonction des développements techniques améliorant la phase de refroidissement lors de l'impression : 0 – sans refroidissement ; 1 – refroidissement uniquement par le plateau d'impression ; 2 – couplage du refroidissement par le plateau et par le jet d'air comprimé. 132

Figure 2.1. Concept « Glyc 3D » : couplage entre la réaction de glycation et l'I3D alimentaire pour la texturation d'un aliment carné imprimé. 134

Figure 2.2. Schéma simplifié de la réaction de glycation. A noter que la glycation est également étudiée dans le domaine médical car impliquée dans des pathologies telles que le diabète ou plus généralement dans le vieillissement cellulaire (Jaisson, Desmons, Gorisse & Gillery, 2017). Les « Advanced Glycation End Products » (AGEs) formés lors de la glycation sont délétères pour la santé, qu'ils soient d'origine alimentaire ou formés dans l'organisme. Les AGEs générés lors des étapes avancées de la réaction peuvent se cumuler avec ceux formés in vivo (Birlouez-Aragon, Morales, Fogliano & Pain, 2010 ; Ramasamy, Yan & Schmidt, 2011). Il est donc important d'accorder une attention particulière à ces composés, notamment en évaluant leur présence dans les aliments (Feng et al., 2021). 136

Figure 2.3. Schéma simplifié de la réaction de N-glycation (D'après Portanguen et al., en cours de révision). 138

Figure 2.4. Schéma simplifié de la réaction de O-glycation (D'après Portanguen et al., en cours de révision). 139

Figure 2.5. Les différentes voies de formation des triple-hélices au sein de la gélatine (selon Portier (2016). 155

Figure 2.6. Exemples de liaisons hydrogène (en rouge) dans les chaînes de gélatine (a) et entre les chaînes de gélatine et les molécules d'eau (b) (d'après Duconseille et al., 2015). 155

Figure 2.7. Principaux glucides réducteurs utilisés pour initier la réaction de glycation dans des matrices alimentaires. 157

Figure 2.8. Courbe théorique d'une mesure de TPA correspondant à deux compressions successives de l'échantillon analysé. A1 et A2 : aires sous les courbes ; 1) Dureté = force maximale ; 2) Elasticité = temps de contact outil/échantillon ; 3) rapport de surface entre les 2 pics. 163

Figure 2.9. Observations en Microscopie Electronique à Balayage (grossissement : x8000) de : A – protéines de blanc d'œuf natives (absence de glucides) ; B – en présence de glucides avec un ratio de 1 :10 (isomalto-oligosaccharide), mais sans chauffage ; C – de protéines et d'isomalto-oligosaccharide avec un ratio de 1 :10, chauffés pendant 72 h à 60 °C (d'après Wang et al., 2020). 165

Figure 2.10. Analyse d'un échantillon protéique par spectrométrie de masse (approches Maldi-TOF/MS en haut et MS/MS en bas). 167

Figure 2.11. Effet d'une sonde de pénétration de 10 mm de diamètre sur un gel de gélatine. Malgré une répétabilité acceptable (n=9 répétitions), la charge de compression est faible, proche de la limite de détection du capteur de force et, la déformation liée à la compression se traduit par 2 pics (entourés en vert et en rouge). Le second pic (entouré en rouge) se produit après la fracture du gel. 177

Figure 2.12. Dispositifs permettant de tester la répétabilité des mesures du pénétromètre pour des gels de diamètre 27 et 90 mm. A - Conception des dispositifs (CAO), B – Dispositifs imprimés en 3D (acide polylactique), et C – Mesures sur le texturomètre Instron dans le cas d'un gel de 90 mm de diamètre. 178

Figure 2.13. Démarche expérimentale utilisée pour comprendre les mécanismes de la glycation au sein de gels de gélatine**.** 183

Figure 2.14. Mesures de répétabilité (n=36) de la force maximale avec une sonde de pénétration de 2 mm de diamètre sur des gels de gélatine de 90 mm de diamètre et de teneurs en eau égales à 3 kg_{eau}/kg_{MS} (bleu foncé) et à 4 kg_{eau}/kg_{MS} (bleu foncé). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type. Une valeur aberrante a été mise en évidence par le test de Grubbs (P-value = 0,01) pour la mesure 33 (gel à 4 kg_{eau}/kg_{MS}). 188

Figure 2.15. Evaluation de la répétabilité des mesures de pénétration avec la sonde de 2 mm de diamètre dans des gels de gélatine de 90 mm de diamètre. Représentation sous la forme d'une carte de contrôle. 188

Figure 2.16. Exemple de spectres d'absorption obtenus dans le cas de gels de gélatine glyqués à 70 °C, pendant 90 min, avec une concentration de 5 % en D-ribose et à pH 9.....189

Figure 2.17. Spectres d'absorption de gels de gélatine glyqués en fonction de la durée et des températures réactionnelles. A-C – Spectres obtenus à 50, 70 et 90 °C au bout de 90 min de réaction ; D-E - Spectres obtenus à 50, 70 et 90 °C au bout de 180 min de réaction ; G – condition la plus poussée : 130 °C ; 90 min et 7% de D-ribose. 191

Figure 2.18. Récapitulatif des absorbances maximales entre 288 et 292 nm en fonction de la concentration en D-ribose, de la durée et de la température réactionnelle. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM). 192

Figure 2.19. Valeurs de pH du milieu réactionnel avant et après acidification par la glycation, en fonction de la concentration en D-ribose. Exemple du tampon Tris pH 9. Conditions de glycation : 90 °C, 180 min pour une gélatine d'indice Bloom 200. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM). 193

Figure 2.20. Valeurs de pH du tampon Tris et du milieu réactionnel avant et après glycation, pour une concentration en D-ribose de 5 % et une durée de 90 min, à 50 °C. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM). 194

Figure 2.21. Force maximale du gel mesuré au texturomètre en fonction du pH et de la température réactionnelle, avec 5 % de D-ribose. Préparation avec du tampon Tris 1 M. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM).....195

Figure 2.22. Différences de couleur observables entres des gels de gélatine non-glyqués (NG) et glyqués (G). Exemple de la gélatine d'indice Bloom 125 pour les conditions réactionnelles suivantes : 180 min à 50 °C, 5 % de D-ribose, pH 9.....196

Figure 2.23. Spectre Maldi-TOF/TOF d'un gel de gélatine glyqué (indice Bloom 200), sans hydrolyse enzymatique préalable.....199

Figure 2.24. A – Spectres Maldi-TOF/TOF en mode réflectron, obtenus après hydrolyse enzymatique à la trypsine de gels de gélatine : 90 °C sans D-ribose (en rouge), 90 °C avec 3 % de D-ribose (en vert), 50 °C sans D-ribose (en rose), 50 °C avec 3 % de D-ribose (en bleu). B – Spectres représentant l'intensité du calibrant peptidique (en rouge) et de la condition 50 °C 3 % de D-ribose (en bleu). 200

Figure 2.25. Carte protéomique correspondant à un gel de gélatine d'indice Bloom 200 préparé à partir de gélatine en poudre. Les acides aminés qui ont réagi avec le D-ribose pour former des conjugués par O-glycation sont colorés en bleu.....202

Figure 2.26. Observations faites en microscopie électronique à transmission (MET) et réalisées sur des gels de gélatine de différents degrés Bloom (B125 vs. B200), de différentes teneurs en eau initiales (Sec – S vs. Humide – H) et en présence ou absence de D-ribose (Glyqué – G vs. Non-Glyqué – NG). A: B125-SNG; B: B200-SNG; C: B200-SNG; D: B125-HNG; E: B200-HNG; F: B200-HNG; G: B125-HG; H: B200-HG; I: B125-SG; et J: B200-SG. 205

Figure 2.27. Spectres moyens correspondant aux 8 conditions expérimentales de préparation des gels de gélatine (2 indices Bloom des gélatines x 2 teneurs en eau initiales x présence ou absence de D-ribose). Les bandes spectrales d'intérêt identifiées par rapport aux données de la littérature sont indiquées, ainsi que les valeurs maximales d'absorbance (Prétraitement = EMSC, incluant une normalisation des spectres). 207

Figure 2.28. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir des 12 conditions Glyquées (G) et des 12 conditions Non-Glyquées (NG) au niveau de la bande spectrale intermédiaire, située entre les bandes Amide A et B. Le nombre d'onde 3250 cm^{-1} est attribué à la vibration d'élongation de la liaison peptidique (traitement : dérivée seconde des spectres). 208

Figure 2.29. Analyse en composante principale. Effet de l'ajout de D-ribose (G vs. NG) et de la teneur en eau initiale (H vs. S), dans des gels de gélatine, sur les absorbances (après dérivée seconde) mesurées au niveau de la bande spectrale attribuée aux glucides (ACP réalisée avec « The Unscrambler »).....210

Figure 2.30. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale

attribuée aux glucides, après dérivée seconde des spectres. (–) condition Humide/Non-Glyquée (HNG) ; (–) condition Humide/Glyquée (HG) ; (–) condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; (–) condition Sèche/Glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. 211

Figure 2.31. Analyses en composante principale (les composantes principales présentant les meilleures séparations sont représentées). Effet de l'indice Bloom (125 en bleu, 200 en rouge) des gélatines sur les absorbances mesurées dans les bandes spectrales attribuées aux fonctions Amides I, II et III ainsi qu'aux glucides. A – Bande Amide I (1750-1600 cm^{-1}) ; B – Bande Amide II (1599-1500 cm^{-1}) ; C – Bande Amide III (1340-1220 cm^{-1}). 213

Figure 2.32. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide I, après dérivée seconde des spectres. (–) condition Humide/Non-Glyquée (HNG) ; (–) condition Humide/Glyquée (HG) ; (–) condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; (–) condition Sèche/Glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. Les nombres d'onde indiqués sont associés à des vibrations de la bande Amide I (étirement de la liaison C=O) (Movasaghi et al., 2008). 214

Figure 2.33. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide II, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. 216

Figure 2.34. Analyses en composante principale. Absorbances mesurées (dérivée seconde) sur la bande spectrale attribuée à la fonction Amide II (1599-1500 cm^{-1}). A – Effet de l'indice Bloom (B125 en bleu vs. B200 en rouge) ; B – Effet de la teneur en eau initiale (H vs. S). 217

Figure 2.35. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide III, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. 218

Figure 2.36. Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale 3600-3200 cm^{-1}, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. 220

Figure 2.37. Mesures de la force de gels préparés avec deux lots différents de gélatine en poudre d'indice Bloom 200, issus d'un même fournisseur. A - un tampon pH 9 à 0,1 M ne permet pas de différencier les conditions de glycation ; B – pour un tampon pH 9 à 1 M, une différence significative a été observée entre le témoin non-glyqué (en bleu) et la condition « glyquée » contenant du D-ribose (en orange), suite à l'application du test de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$). 224

Figure 2.38. Représentation graphique des courbes des modules de stockage (G') et de module de perte (G"), en fonction de la contrainte de cisaillement, obtenues pour un gel de gélatine préparé à base de gélatine d'indice Bloom 125 en condition Sèche/Glyquée (SG). Les paramètres calculés (τ-croisement, G' max et τ -fin-LVR) sont indiqués en vert. 225

Figure 2.39. Courbes moyennes du module de stockage (G') et du module de perte (G"). A - Courbes moyennes G' et G'' pour les conditions Bloom 125-Humide et B125-Sèche. B - Courbes moyennes G' et G'' pour les conditions Bloom 200-Humide et B200-Sèche. Ces courbes ont été calculées à partir de la moyenne de 3 répétitions, les barres d'erreur correspondant à l'erreur standard à la moyenne (SEM). 228

Figure 2.40. Synthèse des principaux résultats obtenus concernant les mécanismes de la glycation au sein de gels de gélatine, en fonction des méthodes analytiques utilisées. Les conditions expérimentales varient en fonction du degré Bloom des gélatines (B125 ou B200), de la teneur en eau initiale des poudres de gélatine (Sec – S ou Humide – H) et de la présence ou l'absence de D-ribose (Glyqué – G ou Non-Glyqué – NG). 233

Figure 3.1. Représentation simplifiée de la procédure de conception d'un aliment fonctionnel établie par Tkaczewska et al., 2021).....244

Figure 3.2. Différents types de structure de remplissage de formes hexagonales imprimées en chocolat par (Mantihal et al., 2017) pour l'étude des propriétés mécaniques : A – avec supports croisés ; B – avec supports parallèles ; C – sans support.....246
Figure 3.3. Modélisation numérique de différents motifs, à différents pourcentages de remplissage interne, utilisés pour imprimer des structures en chocolat (d'après Mantihal et al., 2019).....247
Figure 3.4. Image de graines de lin doré en solution dans de l'eau à température ambiante. Le mucilage en cours d'extraction est visible, après coloration au bleu de toluidine. Son épaisseur autour de la graine a été mesurée au stéréomicroscope (image prise au laboratoire, non publiée). 252
Figure 3.5. Allures des courbes de viscosité pour différents types de fluides : 1) fluides Newtoniens ; 2) fluides non-Newtoniens rhéofluidifiants ; 3) fluides non-Newtoniens rhéoépaississants ; 4) fluides non-Newtoniens plastiques (D'après Schramm, 1981). 257
Figure 3.6. Représentation graphique de la Région Viscoélastique linéaire, d'un échantillon de viande de bœuf broyé et tamisé (à 30 °C), calculée à partir de courbes expérimentales de balayage en déformation. La déformation γ est ici exprimée en % sur une échelle logarithmique. Zone A – La déformation appliquée n'a pas d'effet sur la microstructure de l'échantillon ; Zone B – La déformation est réversible ; Zone C – La déformation est irréversible, l'échantillon s'écoule. 260
Figure 3.7. Représentation graphique des paramètres rhéologiques, déterminés en régime oscillatoire, sur de la viande de bœuf broyée et tamisée (à 30 °C). 261
Figure 3.8. Illustration du phénomène de gonflement à l'extrusion pour une solution aqueuse de polyacrylamide (2 %) (D'après Guazzelli, 2001). 263
Figure 3.9. Représentation schématique de l'impression 3D de systèmes particulaires concentrés en particules molles. Les flèches noires représentent le glissement des particules les unes sur les autres et sur la paroi de la buse (D'après (Masbernat, 2021). 264
Figure 3.10. Prototype de seringue en acier inoxydable 316L développé au laboratoire. A – Vue entière de la modélisation CAO de la seringue ; B – Vue en coupe de la modélisation CAO ; C – Seringue après impression et reprise d'usinage ; D – Seringue plastique utilisée dans l'imprimante 3D alimentaire. ...266
Figure 3.11. Photographie d'un piston en PTFE et acier. Modèle propriétaire, utilisable dans le doseur volumétrique Precifluid®.....267
Figure 3.12. Vue en coupe d'une : A – buse d'extrusion, dont la paroi a une épaisseur de 0,25 mm ; et B – buse d'extrusion dont la paroi a été renforcée à 1 mm d'épaisseur, de façon à éviter toute déformation lors de l'impression 3D métal. 268
Figure 3.13. Raccord modélisé pour l'assemblage de la buse et de la seringue. 268
Figure 3.14. Vue entière de la nouvelle buse d'extrusion. A – Vue avant (orifice d'extrusion) ; B – Vue arrière (connexion à la seringue). 268
Figure 3.15. Buse d'extrusion imprimée en 3D métal et destinée au simulateur d'extrusion. A - Diamètre de l'extrémité de la buse après reprise d'usinage et mesuré au stéréo-microscope ; B – Buse soudée dans le raccord à vis. 269
Figure 3.16. Représentations schématiques et photographies du bâti qu'il a été nécessaire de concevoir afin de permettre le positionnement de la seringue et de la buse d'extrusion sur le texturomètre. A – Modélisation CAO du bâti ; B – Assemblage CAO (le raccord (**Figure 3.13**) n'est pas positionné pour plus de lisibilité) ; C1 et C2 – Photographies après installation sur le texturomètre. 270
Figure 3.17. Capture d'écran du logiciel TrapeziumX (texturomètre). Exemple d'un fichier de méthode programment la descente du piston à une vitesse de 2,08 $mm.min^{-1}$. 272
Figure 3.18. Photographies : A – Rhéomètre HAAKE MARS iQ Air ; B – Géométries de type plan-plan de 60 et 35 mm de diamètre, utilisées pour caractériser le comportement rhéologique des différentes formulations d'aliments. 276
Figure 3.19. Capture d'écran du logiciel Rheowin Job Manager (rhéomètre). Exemple d'une méthode de balayage en fréquence dans la région linéaire viscoélastique destinée aux mesures rhéologiques sur les formulations contenant de la viande. 278
Figure 3.20. Comportement rhéologique à 30 °C du mucilage de graines de lin en fonction du mode d'extraction mis en œuvre. Les temps indiqués pour les mucilages extraits à froid correspondent à des durées de sonication (min). Ces courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur

correspondent aux erreurs standards à la moyenne (SEM).....280
Figure 3.21. Evolution de la viscosité apparente des différents mucilages, à 30 °C, en fonction de la contrainte de cisaillement : A – Mucilage extrait à chaud ; B – Mucilages extraits à froid avec des durées de sonication de 0, 30 et 60 min, respectivement. Ces courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM. 282
Figure 3.22. Viscosités apparentes des mucilages, à 30 °C, en fonction du taux de cisaillement. Mucilages extraits à chaud et à froid avec des durées de sonication de 0, 30 et 60 min, respectivement. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 283
Figure 3.23. Evolution de la viscosité des mucilages soumis à une rampe de température (20 à 50 °C). Le taux de cisaillement est fixé à 7 s^{-1}. Les temps indiqués pour les mucilages extraits à froid correspondent aux durées de sonication (0, 30 ou 60 min). Les courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM. 284
Figure 3.24. Viscosités apparentes des différentes formulations, mesurées à 30 °C, en fonction du taux de cisaillement (entre 1-100 s^{-1}). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 287
Figure 3.25. Classement des formulations selon leur valeur de G'max lors d'un balayage en déformation (0-1000 s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 289
Figure 3.26. Evolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') des formulations de viande pure (V-P) et de viande avec mucilage extrait à chaud (6 % et 18 %) mesurés lors d'un balayage en déformation (0-1000 %). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 290
Figure 3.27. Evolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') des formulations de viande pure (V-P) et de viande avec mucilage extrait à chaud (6 et 18 %) lors d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 291
Figure 3.28. Classement des formulations selon l'amplitude du module de conservation (G') lors d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 292
Figure 3.29. Classement des formulations selon la longueur de leur Région Viscoélastique Linéaire (LVR) lors d'un balayage en déformation (0-1000 s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 294
Figure 3.30. Classement des formulations selon leur seuil d'écoulement (contrainte minimale) en fonction de la contrainte de cisaillement (τ). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 295
Figure 3.31. Classement des formulations selon leur difficulté à être extrudées (G' = G'' en fonction de la déformation de cisaillement ɣ %). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (Analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 296
Figure 3.32. Formulations de viande de bœuf imprimées en 3D avec l'imprimante Ghost modifiée (**Chapitre 2**). A – Viande pure, vue de dessus ; B – Viande pure, vue de face ; C – Viande + 6 % de mucilage extrait à chaud + 9 % de gélatine (tous les échantillons contiennent 1 % de farine de lupin).....296
Figure 3.33. Classement des formulations selon la valeur du facteur d'amortissement calculé et, représentant la force du réseau interne et son élasticité : tan (δ) = f (ω rad.s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 298
Figure 3.34. Représentation graphique du facteur d'amortissement (tan δ) moyen calculé à partir d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR). Les barres

d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 298
Figure 3.35. Classement des formulations selon la cohésion de la matrice (calcul de la pente de la courbe du module de conservation – G' après le seuil d'écoulement). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.....300
Figure 3.36. Classement des formulations selon la limitation de l'écoulement avant impression (valeur du module de perte – G'' au repos au cours d'un balayage en déformation). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 301
Figure 3.37. Visualisation du comportement d'amincissement par cisaillement des différentes formulations par représentation de leur viscosité complexe en fonction de la fréquence d'oscillation. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 303
Figure 3.38. Illustration du phénomène d'amincissement par cisaillement. Capture vidéo de l'écoulement d'une matrice constituée de viande pure à la suite d'une extrusion au travers d'une buse de 0,97 mm de diamètre, à une vitesse de 2,08 $mm.min^{-1}$. La vidéo a été réalisée avec une caméra Canon EOS 70D (objectif 18/300 réglé à 300 mm), à une fréquence de 25 images par seconde (full HD). L'image présentée a été extraite du film avec le lecteur multimédia VLC 3.0.18 Vetinari.....303
Figure 3.39. Mesures des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la température, entre 20 °C et 50 °C, avec une augmentation de 2 °C/min : A – Comparaison viande pure (V-P) et viande salée (V-S) ; B – Comparaison viande pure (V-P) et viande + mucilage extrait à chaud 6 % et 18 % (V-M ch 6 % et V-M ch 18 %) ; C – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 6 % de mucilage extrait à froid, sans et avec 30 min de sonication (V-M fr t0 6 % et V-M fr t30 6 %) ; D – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 18 % de mucilage extrait à froid, sans et avec 30 min de sonication (V-M fr t0 18 % et V-M fr t30 18 %) ; E – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 6 % et 18 % de gélatine (V-G 6 % et V-G 18 %). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 309
Figure 3.40. Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 $mm.min^{-1}$ sur la viscosité apparente, en fonction du taux de cisaillement, de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S) ; C – viande + 6 % de mucilage extrait à chaud ; D – viande + 18 % de mucilage extrait à chaud. Les graphiques en histogrammes représentent, pour chaque formulation, les analyses statistiques réalisées sur les viscosités apparentes maximales. Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 315
Figure 3.41. Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D, à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 $mm.min^{-1}$, sur la viscosité complexe de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S) ; C – viande + 6 % de mucilage extrait à chaud ; D – viande + 18 % de mucilage extrait à chaud. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 316
Figure 3.42. Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D, à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 $mm.min^{-1}$, suite à un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 $rad.s^{-1}$) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR) de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions. 318
Figure 3.43. Approche utilisée dans le Chapitre 3 pour la mise au point d'un futur aliment fonctionnel. 320

Figure 4.1. Evaluation de la connaissance de l'I3D sur un panel de 167 personnes, de tous âges. A – Répartition des personnes interrogées par tranche d'âge ; B – Connaissance de l'I3D en général ; C – Connaissance de l'I3D alimentaire ; D – Acceptation pour une consommation quotidienne d'aliments imprimés ; E – Acceptation pour une consommation en cas de pathologie. 330
Figure 4.2. Perception des aliments imprimés en 3D évaluée sur un panel de 167 personnes. 333
Figure 4.3. Evaluation de la durabilité de l'impression 3D alimentaire par un panel de 167 personnes. 334
Figure 4.4. Evaluation de la confiance, par un panel de 167 personnes, dans la parole du scientifique pour la consommation d'aliments imprimés en 3D 334

Figure 4.5. Partie du stand INRAE lors du Salon International de l'Agriculture (SIA) 2023 consacré à l'impression 3D alimentaire : A – Présentation d'une imprimante 3D alimentaire commerciale de marque Foodini (Natural Machine, Espagne) ; B – Exemple d'aliments imprimés sur place et, vidéo d'impression d'un aliment carné avec le prototype d'imprimante 3D développé au laboratoire et présenté dans le **Chapitre 1**).....337

Figure 4.6. Evaluation de la connaissance de l'impression 3D alimentaire par les membres (n=23) de l'Association « Les Gourmets Curieux » ayant participé à la soirée « Présentation de l'impression 3D alimentaire » d'Avril 2023. 338

Figure 4.7. Evaluation de l'acceptation de la consommation d'aliments imprimés par les membres (n=23) de l'Association « Les Gourmets Curieux » ayant participé à la soirée « Présentation de l'impression 3D alimentaire » d'Avril 2023. 338

Listes des tableaux

Tableau 0.1. Liste non exhaustive des principales techniques d'I3D, avec leurs avantages, leurs inconvénients (pour des critères d'utilisation choisis arbitrairement) et leurs domaines d'application. Un « + » signifie que le critère en question est considéré comme un avantage pour la technique ad hoc, un « - » est présenté comme une limite de la technique. Un « / » signifie que les données ne sont pas connues ou non communiquées.....42

Tableau 0.2. Principales méthodes d'impression 3D alimentaires : technologies utilisées et paramètres de fonctionnement associés en fonction du type d'aliments. Seules les études comportant des données chiffrées sont présentées.....50

Tableau 0.3. Avantages et inconvénients des principales méthodes de cuisson utilisables en I3D alimentaire.71

Tableau 1.1. Liste des matériels et équipements utilisés pour cette étude.....84

Tableau 1.2. Principaux avantages et inconvénients liés à l'utilisation du premier prototype d'imprimante 3D alimentaire conçue au laboratoire sur la base d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). 95

Tableau 1.3. Effet de la pression d'air et de la température de régulation des résistances chauffantes sur la température d'air à 30 mm de la sortie de l'échangeur. Les valeurs des températures et des vitesses indiquées correspondent à des valeurs moyennes obtenues après une stabilisation de 600 s.....130

Tableau 2.1. Paramètres expérimentaux communément appliqués pour la réaction de glycation. 140

Tableau 2.2. Composition en acides aminés de la gélatine de type A extraite de peau de porc (en g de résidus d'acides aminés/100 g protéines) (d'après Eysturskarð, Haug, Elharfaoui, Djabourov & Draget, 2009). 153

Tableau 2.3. Méthodes analytiques complémentaires, utilisables pour le suivi de la réaction de glycation. ..160

Tableau 2.4. Définition mécanique et signification physiologique des 5 paramètres mesurés par TPA.....163

Tableau 2.5. Liste des matériels utilisés pour les expérimentations de glycation de gels de gélatine.....172

Tableau 2.6. Liste des produits utilisés dans la composition des différents gels de gélatine.....173

Tableau 2.7. Liste des réactifs utilisés en fonction des méthodes analytiques mises en œuvre pour caractériser la réaction de glycation dans les gels de gélatine. 174

Tableau 2.8. Teneurs en eau mesurées dans les ingrédients utilisés pour la préparation des gels de gélatine et prises en compte dans les calculs de masse pour la préparation de ces gels.....175

Tableau 2.9. Ensemble des logiciels utilisés pour l'acquisition ou le traitement des données expérimentales en lien avec la caractérisation de la glycation dans des gels de gélatine. 175

Tableau 2.10. Nomenclature des échantillons de gels de gélatine préparés pour les différentes analyses. 183

Tableau 2.11. Mesures de couleur obtenues au moyen d'un spectrocolorimètre sur des gels préparés avec des gélatines de différents degrés Bloom (B) et teneurs en eau initiales. Deux valeurs moyennes (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test à plages multiples de Tukey ($P > 0,05$). Les comparaisons ont été faites dans les colonnes de même couleur. 197

Tableau 2.12. Dosage des protéines dans des gels de gélatine glyqués ou non par la méthode Direct Detect®, après 21h de digestion enzymatique (résultats exprimés en $mg.mL^{-1}$). 198

Tableau 2.13. Nombre de peptides obtenus après hydrolyse enzymatique de gels de gélatine glyqués (Bloom 200), par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), à partir de la protéine majoritaire (Collagène de type I chaîne alpha 1) ou des protéines totales. 198

Tableau 2.14. Nombre d'ondes correspondants aux bandes spectrales d'intérêt (cm^{-1}) relevés dans la littérature sur des matrices carnées. 206

Tableau 2.15. Nombre de variations d'absorbance significativement différentes entre les 8 conditions expérimentales (décrites dans la **Figure 2.13**). Les valeurs correspondent aux absorbances moyennes calculées, significativement différentes (test de Student) entre les indices de Bloom (B125 vs. B200), entre les teneurs en eau (S vs. H) et entre l'ajout ou non de D-ribose (G vs. NG). 208

Tableau 2.16. Variations d'absorbance, attribuées à la vibration d'un cycle pyranose, entre les conditions correspondant à l'ensemble des gels glyqués (G) et non-glyqués (NG) (unités arbitraires). Comparaison des absorbances après calcul de la dérivée seconde par nombre d'onde (test de Student, P < 0,05). ..209

Tableau 2.17. Les maximums des pics de la bande spectrale attribuée à l'Amide I, pour chaque indice Bloom (125 et 200) sont indiqués en fonctions des conditions opératoires : Humide/Non-Glyquée (HNG) ; condition Humide/Glyquée (HG) ; condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; condition Sèche/Glyquée (SG). Chaque valeur est une moyenne calculée à partir de 30 spectres. 215

Tableau 2.18. Rapport Amide III/A 1450 cm^{-1} représentant la quantité de triple-hélices en fonction des conditions expérimentales. Plus le rapport est proche de 1, plus le nombre de triple-hélices est élevé. 222

Tableau 2.19. Valeurs moyennes (n=18) des 5 paramètres de texture de gels de gélatine obtenus par le test TPA en fonction de l'indice Bloom (B125 vs. B200), de la teneur en eau initiale (Sec, S vs. Humide, H), et de la présence ou non de D-ribose (Glyqué, G vs. Non-Glyqué, NG). Deux valeurs moyennes (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre de texture, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux. 222

Tableau 2.20. Effet de l'indice Bloom (B125 vs. B200), de la teneur en eau initiale (Sec vs. Humide) et de l'ajout de D-ribose (Glyqué vs. Non-Glyqué) sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux. 226

Tableau 2.21. Effets de l'ajout de D-ribose en fonction de la teneur initiale en eau de la gélatine sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux. 226

Tableau 2.22. Effets de l'ajout de D-ribose en fonction du degré Bloom de la gélatine sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux. 229

Tableau 3.1. Exemples d'aliments hyper-protéinés alternatifs disponibles dans le commerce et destinés aux personnes présentant des troubles de la mastication. 236

Tableau 3.2. Matériels utilisés pour la préparation et l'analyse des matrices alimentaires. 265

Tableau 3.3. Vitesses de déplacement du Precifluid mesurées, puis transposées sur le texturomètre. 271

Tableau 3.4. Valeurs de teneur en eau, d'activité de l'eau (a_w) et de pH des matières premières utilisées et servant de base au futur aliment fonctionnel. 272

Tableau 3.5. Composition et valeur nutritionnelle des graines de lin doré utilisées pour l'extraction du mucilage, ainsi que celles de la farine de lupin ajoutée aux préparations. 273

Tableau 3.6. Composition des différentes formulations préparées pour l'évaluation des propriétés d'imprimabilité (mesures rhéologiques). 275

Tableau 3.7. Nomenclature des échantillons utilisés lors des mesures rhéologiques des différentes formulations de prototypes d'aliments. 275

Tableau 3.8. Les différentes méthodes utilisées et les paramètres associés aux mesures sur le rhéomètre HAAKE MARS iQ Air. Le type de géométrie est défini par le diamètre (35 ou 60 mm) et par l'état de surface (strié pour la géométrie P35 et sablé pour la géométrie P60). 278

Tableau 3.9. Viscosités apparentes maximales et leur taux de cisaillement associés pour les différentes formulations testées (mesures rotationnelles). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les valeurs correspondent aux moyennes avec les SEM associées calculées à partir de 3 répétitions). 286

Tableau 3.10. Moyennes des principaux paramètres extraits des courbes de rhéologie suite aux mesures oscillatoires. Les valeurs correspondent aux moyennes (± SEM, calculées à partir de 3 répétitions). Pour

plus de lisibilité, les résultats des analyses statistiques ne sont pas indiqués dans ce tableau, mais sur les histogrammes présentés tout au long de cette section. 288

Tableau 4.1. Evaluation de la connaissance de l'I3D et de l'I3D alimentaire par tranche d'âge (n=167).....331

Liste des annexes

Annexe S 0.1. *Les méthodes d'impression 3D respectant la norme ISO/ASTM52900-15.* 371

Annexe S 2.1. *Préparation des gels de gélatine à teneur en eau fixée.* 376
Annexe S 2.2. *Protocole d'hydrolyse enzymatique pour analyse MS/MS.* 377
Annexe S 2.3. *Préparation des échantillons pour dépôt sur plaque Maldi-TOF/TOF.* 379
Annexe S 2.4. *Moules pour gels de gélatine conçus par CAO et imprimés en 3D.* 381
Annexe S 2.5. *Préparation d'échantillons pour les observations microscopiques.* 382

Annexe S 3.1. *Protocole d'extraction du mucilage à froid.* 389
Annexe S 3.2. *Protocole d'extraction du mucilage à chaud.* 390
Annexe S 3.3. *Protocole de broyage des échantillons de viande à l'azote liquide.* 391

Annexe S 4.1. *Questionnaires présentés à différents publics.* 392

Annexe V 1. *Production scientifique en lien avec le sujet de thèse. Période 2018-2023.* 396
Annexe V 2. *Apprentissage du métier de chercheur.* 400
Annexe V 3. *Liste des documents de transferts réalisés au cours de ce travail de thèse.* 405
Annexe V 4. *Article « Portanguen et al. (2019) Trends in Food Science & Technology ».* 413
Annexe V 5 *Article « Portanguen et al. (2022) Foods »* 424
Annexe V 6. *Chapitre « Portanguen et al. (2022) Elsevier Inc ».* 441
Annexe V 7. *Article « Portanguen et al. (2023) Food Hydrocolloids ».* 459
Annexe V 8. *Chapitre « Duconseille & Portanguen (2023) Presses de l'école des Mines ».* 470

Introduction

Dans les prochaines décennies, l'accroissement et le vieillissement de la population (2.1 milliards d'individus de plus de 60 ans en 2050, dont 434 millions de plus de 80 ans, pour une population totale estimée à près de 10 milliards de personnes) (OMS, 2023) vont entraîner des conséquences sur les modes d'alimentation. Ces phénomènes sont à prendre en compte, dès maintenant, afin d'aller vers une transition alimentaire adaptée aux besoins de chacun. Le travail présenté ici va s'attacher à proposer une démarche permettant d'aboutir à une solution innovante pour les personnes ayant une prédisposition à la dénutrition, mais aussi permettre de prendre en compte la dimension de durabilité au travers d'une maîtrise des procédés et des ressources alimentaires. C'est donc dans un contexte démographique mondial en pleine évolution que s'inscrit ce travail de thèse.

Au-delà de cette évolution démographique, l'Organisation Mondiale de la Santé prévoit entre 20 et 30 % d'édentés totaux dans le monde, dès 2030 (WHO et al., 2016). Ceci aura pour conséquence une surreprésentation de la dénutrition, pour partie responsable de l'apparition de la sarcopénie. Ce phénomène « naturel » de fonte musculaire peut apparaître dès 50 ans, mais peut aussi être potentialisé de manière multifactorielle par, notamment, des insuffisances nutritionnelles partielles (en particulier, en protéines). Il entraîne une perte de masse de muscle squelettique et aboutit à de nombreux effets indésirables (déclin fonctionnel, incapacité physique, chutes, fractures…), qui peuvent aller jusqu'au décès de la personne (Gumussoy et al., 2021). Ces auteurs affirment également que la sarcopénie est étroitement liée à la malnutrition et que ces affections interagissent les unes avec les autres. D'un point de vue physiopathologique, la sarcopénie et la malnutrition partagent de nombreuses similitudes : un état inflammatoire faible, une diminution de l'apport énergétique et protéique, une réduction de la masse musculaire, une vulnérabilité accrue aux maladies, un retard de motricité et une carence en nutriments. Le dépistage de la sarcopénie et de la malnutrition est donc recommandé, car la prévalence de ces deux pathologies augmente avec l'âge. De plus, la malnutrition peut directement entraîner une sarcopénie, car les protéines, les vitamines telles que la vitamine D et les micronutriments sont essentiels au métabolisme musculaire. La prévalence de la sarcopénie chez les personnes âgées varie de 1 à 33 % et est dépendante des conditions de vie des personnes : vie en communauté, soins de longue durée, soins hospitaliers... (Cruz-Jentoft et al., 2014; Saffel-Shrier, Johnson & Francis, 2019). Ce phénomène peut être en partie corrigé par l'alimentation, à condition que les personnes concernées puissent ingérer et assimiler rapidement et correctement une quantité suffisante de protéines de haute qualité nutritionnelle, donc préférentiellement des protéines animales (Buffière et al., 2017; Donaldson, Johnstone, de Roos & Myint, 2018; Saffel-Shrier et al., 2019). Il est d'ailleurs fréquent qu'un âge avancé et la présence de diverses pathologies provoquent

un symptôme de dysphagie[1], qui renforce le phénomène de dénutrition, en perturbant l'ingestion des aliments. Ces éléments démontrent la nécessité de concevoir des aliments fonctionnels, présentant une texture adaptée pour ces populations souffrant de déficiences masticatoires. Une des voies possibles d'innovation dans ce domaine est l'impression 3D (I3D) alimentaire.

L'I3D, ou fabrication additive (**Figure A**), apparaît, dès les années 1980, et se développe de façon quasi-simultanée en France et aux Etats-Unis.

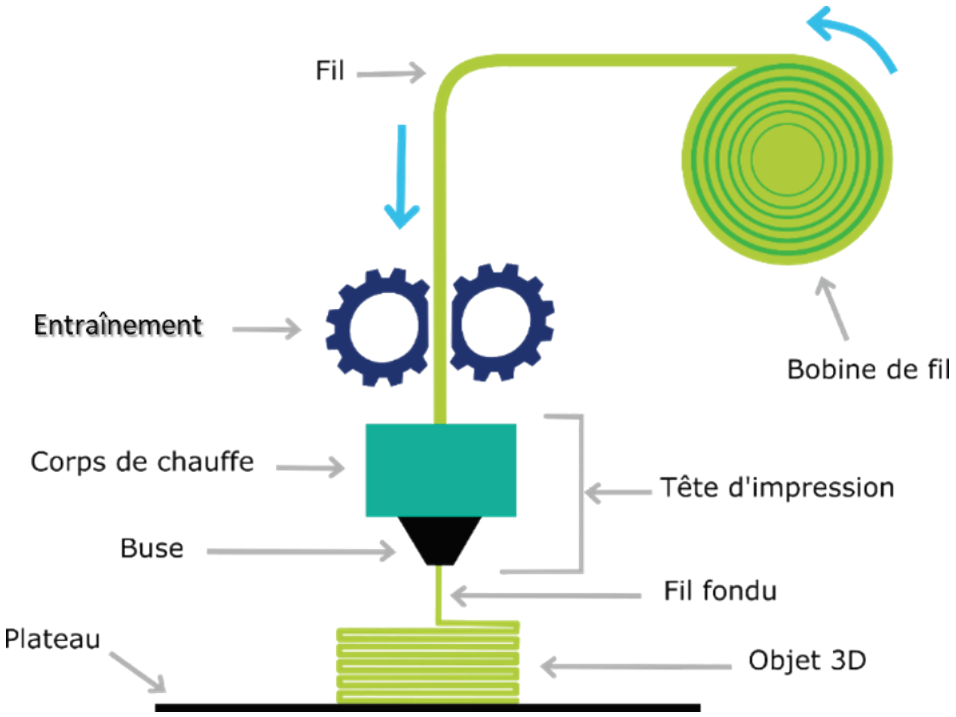


Figure A. *Représentation schématique du principe de fonctionnement d'une imprimante 3D à dépôt de fil fondu (exemple d'un matériau polymère) (D'après myago3d.fr).*

L'essor de l'I3D est resté pendant très longtemps confidentiel pour cause de protection intellectuelle et industrielle, si bien que seuls quelques grands groupes industriels ont pu commencer à l'adapter à leurs propres problématiques de recherche et développement. Mais, depuis la première décennie du XXI^{ème} siècle, une fois les premiers brevets passés dans le domaine public, la technologie est devenue accessible et a pu se développer rapidement. L'I3D est désormais considérée par certains comme la 4ème révolution industrielle, tant le paradigme lié à la conception et à la fabrication d'objets s'en trouve bouleversé. Chaque année, les applications sont de plus en plus nombreuses, et désormais,

[1] La dysphagie est une sensation de gêne ou d'obstacle à la progression des aliments au cours de la déglutition, pouvant survenir par intermittence.

la technologie d'I3D est accessible à un coût très raisonnable. De nouvelles applications et perspectives de recherches émergent dans des domaines inimaginables, il y a seulement quelques années. A ce propos, une revue de la littérature a été rédigée au début de ce travail de thèse (Portanguen, Tournayre, Sicard, Astruc & Mirade, 2019) (*cf*. **Annexe V 4)**, mettant en évidence la diversité des applications et des domaines concernés par l'I3D : mécanique, aéronautique/spatial, architecture… et, bien entendu, la biologie avec les domaines biomédical et alimentaire. Cette revue a également permis de discuter des verrous liés à la conception d'aliments par cette technologie innovante et, en particulier, des aliments fonctionnels à base de viande. A l'époque, plusieurs dizaines d'articles étaient disponibles pour étayer cette revue, mais depuis, la production scientifique, notamment dans le domaine alimentaire, n'a cessé d'augmenter jusqu'à devenir quasi-exponentielle (**Figure B**).

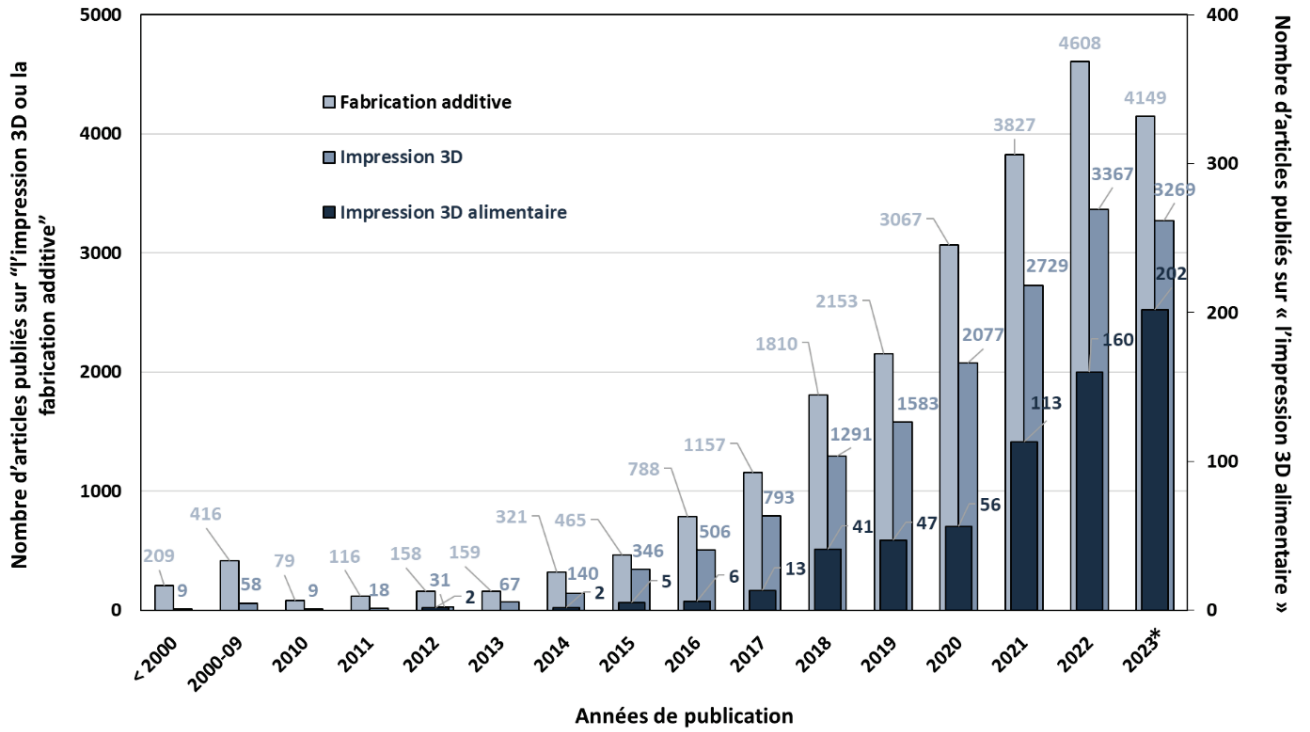


Figure B. *Évolution temporelle du nombre d'articles (incluant les articles de synthèse, les articles de recherche, les chapitres d'ouvrage, les communications courtes, les résumés de conférences...) publiés depuis l'émergence de la technologie d'impression 3D. Les chiffres ont été obtenus à partir de requêtes effectuées sur la plateforme ScienceDirect, en recherchant les expressions suivantes : "additive manufacturing" ou "3D printing" ou "3D food printing" dans les titres, les résumés et les mots-clés des articles en question (*: Les chiffres pour l'année 2023 ne sont que partiels, car établis au 22/09).*

L'I3D alimentaire est probablement l'application la plus récente des technologies d'addition de matière par dépôt de couches successives ; les premiers essais datent de 2007-2008, avec un article publié dans le *Wired Magazine* (Irwin, 2007) traitant de la fabrication de structures en caramel, ou bien encore, avec le brevet de Lai & Cheng (2008) portant sur une nouvelle méthode de fabrication

tridimensionnelle des aliments. Ensuite, entre 2010 et 2012, de nombreux articles ont commencé à traiter des potentialités de cette technologie, en se focalisant essentiellement sur les tendances et les débouchés possibles. Les premiers articles de recherche publiés dans des revues scientifiques apparaissent en 2010 ; citons, par exemple, les travaux de (Hao, Mellor, Seaman, Henderson, Sewell & Sloan, 2010) sur le chocolat. Les premiers articles de synthèse n'apparaissant que 2 à 5 ans plus tard (Lipton, Cutler, Nigl, Cohen & Lipson, 2015; Sun, Peng, Yan, Fuh & Hong, 2015; Sun, Peng, Zhou, Fuh, Hong & Chiu, 2015; Sun, Zhou, Huang, Fuh & Hong, 2015; Wegrzyn, Golding & Archer, 2012). Depuis ces premières études, la littérature scientifique s'est considérablement enrichie et, désormais, de nombreuses équipes de recherches s'intéressent, d'une part, au développement de matériels et plus précisément à la modification d'imprimantes 3D et, d'autre part, à la formulation d'aliments ainsi qu'à leurs propriétés rhéologiques et à leur imprimabilité. L'I3D est dorénavant au cœur d'un ensemble de problématiques qui peuvent être scientifiques, techniques, sociétales… La **Figure C** décrit, de façon schématique, les différents aspects en lien avec l'I3D alimentaire qui doivent être pris en compte pour que cette technologie puisse se développer dans de bonnes conditions.

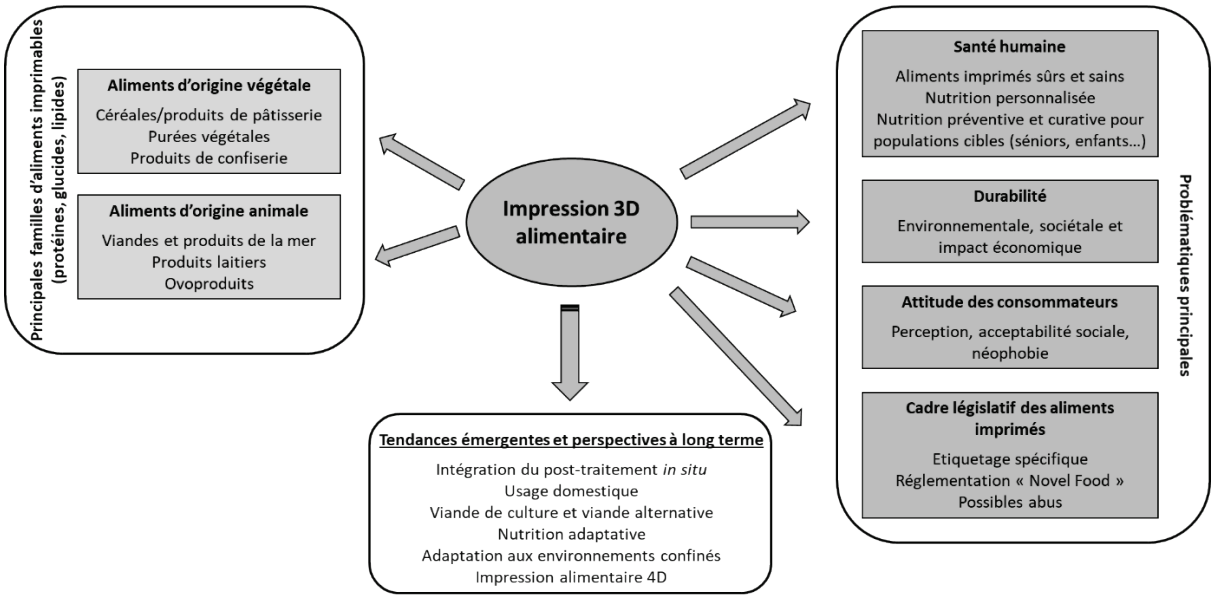


Figure C. *Description schématique des problématiques autour de l'I3D alimentaire (Portanguen, Tournayre, Sicard, Astruc & Mirade, 2022).*

Les recherches sur l'I3D de produits alimentaires ont fait un bond au cours des quatre dernières années, mais peu d'études ont concerné les produits carnés, probablement en raison de la difficulté à les texturer sans utiliser d'agents texturants, ce qui constitue actuellement un verrou (Portanguen et al., 2019). La plupart des applications alimentaires portent donc sur des produits riches en amidon, car

leur imprimabilité est supérieure à celle de la viande et des produits carnés. Après avoir succinctement présenté les différentes technologies d'I3D alimentaire, le **Chapitre 0** de ce mémoire s'attachera à en décrire les applications, ainsi que l'impact du procédé d'impression sur plusieurs types d'aliments et sur les différentes macromolécules contenues dans ces aliments.

Dans un contexte où les consommateurs recherchent de plus en plus de naturalité (produits « clean label »), les aliments formulés doivent être conçus avec le moins d'additifs possible. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, il a été décidé de développer un prototype d'imprimante 3D, qui soit adapté spécifiquement à la texturation des aliments carnés. En effet, les imprimantes 3D alimentaires disponibles dans le commerce présentent certaines lacunes qui ne permettent pas une texturation optimale du produit par le procédé (notamment, en termes de régulation des températures). Le contenu du **Chapitre 1** décrit cette démarche de conception, depuis la fabrication de la machine, jusqu'à sa validation et son utilisation (Portanguen, Tournayre, Gibert, Leonardi, Astruc & Mirade, 2022).

Avec l'idée de maximiser le potentiel de texturation des aliments carnés, outre le développement de procédés d'I3D parfaitement maîtrisés permettant de pré-texturer la matrice, comme indiqué *supra* (Portanguen et al., 2022), nous avons également investigué les potentialités de la réaction de glycation (**Figure D**). Cette réaction biochimique naturelle permet la création de liaisons covalentes entre les groupes carbonyles (aldéhyde ou cétone) des oses simples et les fonctions amine ou hydroxyle des protéines (Sun et al., 2021; Y. Wei, Han, Zhou, Liu, Chen & He, 2012), ce qui tend à augmenter les propriétés fonctionnelles des matrices concernées. La glycation correspond aux phases précoces des réactions de Maillard, découvertes en 1912 par le chimiste français Louis-Camille Maillard, alors qu'il tentait de comprendre la structure des protéines. Les réactions de Maillard sont bien connues en agroalimentaire, car elles sont responsables du brunissement des aliments lors de leur cuisson, ainsi que du goût et de l'odeur caractéristique de la viande rôtie. À notre connaissance, aucune étude n'a encore exploré la combinaison de l'I3D et de la glycation comme méthodes de texturation associées (Portanguen et al., 2023, en cours de révision).

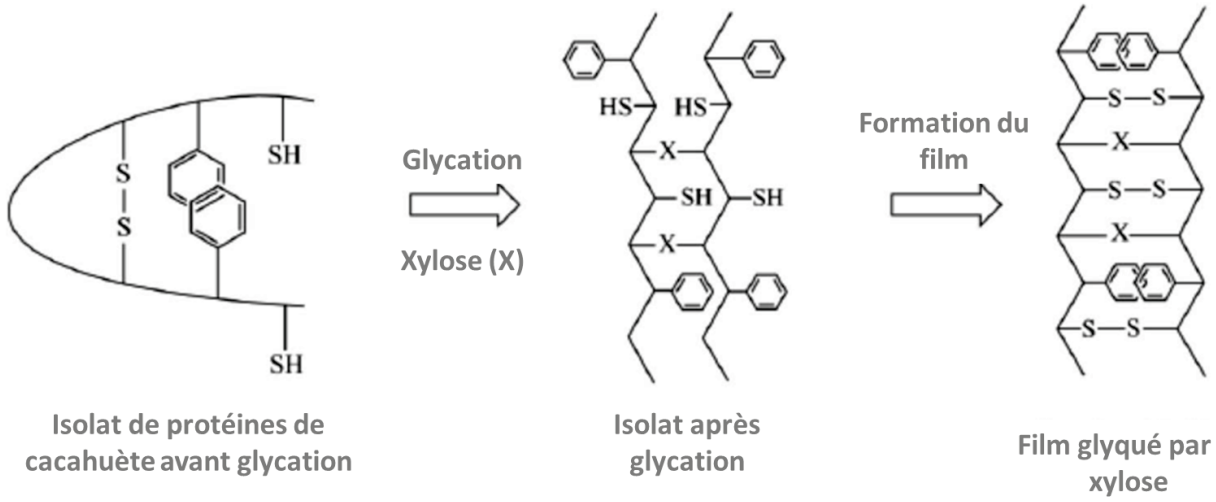


Figure D. *Schématisation des mécanismes de la glycation dans des films à base d'isolats de protéines de cacahuète et de xylose (d'après (Liu et al., 2017).*

La réaction de glycation peut être divisée en trois grandes étapes en fonction de son avancement : phases précoce, tardive et finale (*cf*. **Chapitre 2**). Ainsi, le **Chapitre 2** de ce mémoire traite de l'étude de la réaction de glycation, comme moyen de texturation complémentaire. Afin d'évaluer les effets de la glycation sur la structure moléculaire, un milieu modèle, la gélatine, a été choisi pour deux raisons essentielles : 1) la gélatine est adaptée à la conception d'aliments destinés à des populations souffrant de déficiences orales (difficultés masticatoires, syndrome de dysphagie, situation de handicap…) (Godoi, Prakash & Bhandari, 2016), et 2) elle est issue de coproduits animaux pouvant être valorisés afin de limiter les pertes et gaspillages. Finalement, il s'est avéré que le milieu modèle choisi était beaucoup plus complexe que prévu et surtout très sensible à son environnement, ce qui a rendu la maîtrise de la réaction de glycation et de ses effets sur la texture des gels de gélatine très aléatoires. Le **Chapitre 2** apporte donc des informations sur les mécanismes mis en œuvre lors de cette réaction dans un gel de gélatine, en présence de *D*-ribose et, présente les limites de cette méthode de texturation dans des gels de gélatine, tout en comblant un manque dans la littérature scientifique (Portanguen et al., 2023).

Le **Chapitre 3** pose les bases d'un nouvel aliment fonctionnel, conçu à partir de protéines carnées et d'extraits végétaux : le mucilage, un extrait végétal issu de graines de lin et destiné à servir de substitut salivaire pour des personnes atteintes d'hyposialie[2], de xérostomie[3] et/ou de dysphagie. Les résultats présentés dans ce chapitre sont destinés à évaluer, par des approches rhéologiques,

[2] Baisse de la production de salive.
[3] Sensation de bouche sèche.

l'imprimabilité d'une matrice carnée dans des conditions correspondant au fonctionnement du prototype d'imprimante 3D développé au laboratoire et décrit dans le **Chapitre 1**.

Enfin, concevoir un aliment fonctionnel est important, mais évaluer l'acceptabilité sociale de ce nouvel aliment est essentiel, d'autant plus si celui-ci possède des propriétés spécifiques et, a été fabriqué à l'aide d'une technologie de rupture telle que l'I3D. Le **Chapitre 4** de ce mémoire ambitionne de présenter une première approche en lien avec cette évaluation, qui repose sur une collaboration originale initiée entre les Sciences du Vivant et les Sciences Humaines & Sociales.

Ce travail de thèse avait pour objectif de mettre au point une méthodologie de conception d'aliments fonctionnels par I3D, en s'affranchissant de l'utilisation d'additifs texturants. L'approche que nous avons développée se veut être la plus holistique possible, en prenant en compte différentes dimensions de la texturation des aliments, et ce, à différentes échelles. En plus d'une revue bibliographique portant sur l'I3D (**Chapitre 0**), ce mémoire de thèse se compose de quatre autres chapitres qui vont chacun décrire un des aspects particuliers de la démarche de recherche mise en œuvre (**Figure E**).

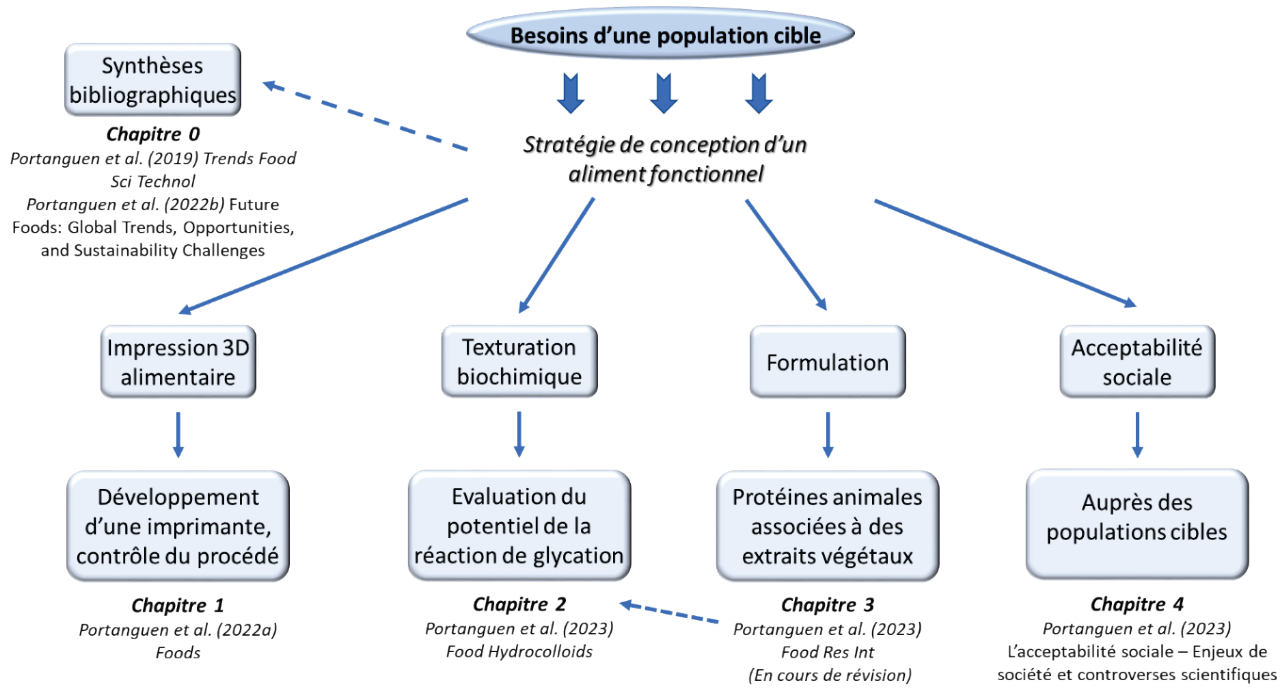


Figure E. *Représentation schématique de la démarche de recherche mise en œuvre dans ce travail de thèse.*

Chapitre 0 :

Revue de littérature de l’impression 3D (ou fabrication additive) à l’impression 3D alimentaire

0.1. Généralités sur l'impression 3D

Les recherches dans le domaine de l'I3D sont nombreuses et variées, cette technologie étant particulièrement adaptée aux phases de prototypage rapide, nécessitant une étude de faisabilité préalable sans production de masse et une fabrication rapide (Attaran, 2017; Berman, 2012). La versatilité est également un argument majeur pour l'utilisation de l'I3D. En effet, le fait de pouvoir travailler à différentes échelles, depuis l'impression de denrées alimentaires à une échelle « macroscopique », jusqu'au dépôt cellule par cellule pour la construction d'organes, offre la possibilité de trouver une technologie d'impression adaptée à chaque besoin.

Avant de se focaliser sur les méthodes d'I3D applicables aux aliments, il est nécessaire de faire un état des lieux succinct des principales technologies existantes, tous domaines confondus. Certaines d'entre elles ont d'ailleurs été utilisées dans le cadre de ce travail de thèse. Le principe de base de l'I3D est de déposer un matériau couche par couche, en respectant une géométrie préalablement conçue numériquement (Bandyopadhyay, Bose & Das, 2015). Différents matériaux peuvent être utilisés tels que les métaux (Fang et al., 2017), les céramiques (Bose, Ke, Sahasrabudhe & Bandyopadhyay, 2018), les plastiques (Chacón, Caminero, García-Plaza & Núñez, 2017), les biomatériaux (Bose et al., 2018; Chia & Wu, 2015), le verre (Attaran, 2017), *etc.* La technique d'impression étant dépendante de l'utilisation finale du produit. De nombreuses techniques existent (**Tableau 0.1**), mais à notre connaissance, seulement sept respectent la norme ISO/ASTM52900-15 : *Additive manufacturing – General principles – Terminology* (*International Organization for Standardization*) (Demircan & Özçelik, 2023) :

Jet de liant (Binder jetting) ;

Dépôt d'énergie dirigée (Direct energy deposition) ;

Jet de matériaux (Material jetting) ;

Fusion/liaison sur lit de poudre (Powder bed fusion/binding) ;

Assemblage de feuilles (Sheet lamination) ;

Photopolymérisation en cuve (Vat photopolymerisation) ;

Extrusion de matériaux (Material extrusion).

Ces sept techniques sont rapidement explicitées en **Annexe S 0.1**, afin de mieux cerner

l'étendue des possibilités offertes par l'I3D. Le **Tableau 0.1** en synthétise les principales caractéristiques. A noter que la technologie *d'extrusion de matériaux* est la plus utilisée, notamment pour les denrées alimentaires.

Tableau 0.1. *Liste non exhaustive des principales techniques d'I3D, avec leurs avantages, leurs inconvénients (pour des critères d'utilisation choisis arbitrairement) et leurs domaines d'application. Un « + » signifie que le critère en question est considéré comme un avantage pour la technique ad hoc, un « - » est présenté comme une limite de la technique. Un « / » signifie que les données ne sont pas connues ou non communiquées.*

Techniques	Dimensions	Vitesse d'impression	Précision	Multi-matériaux	Couleur	Supports requis	Post-traitement	Qualité finale	Coût	Compatibilité biologique	Applications
Jet de liant	/	+	/	+	+	/	-	-	+	/	Prototypage, pièces en couleur
Dépôt énergie dirigée	+	/	/	-	/	/	-	/	/	/	Aviation, armée
Jet de matériaux	/	/	+	+	+	-	/	/	/	/	Médical, modèles anatomiques
Fusion lit de poudre	-	-	/	+	/	+	/	+/-	+	/	Prototypage, décoration
Assemblage de feuilles	/	+	-	+	+	-	-	-	+	/	Prototypage
Photopolymérisation en cuve	/	/	+	-	/	/	/	/	/	+	Joaillerie, dentaire, art
Extrusion	+	+	+/-	+	-	+	/	+/-	+	+	Variées

Ces différentes technologies sont utilisées en fonction de plusieurs critères : les types de matériaux nécessaires, les contraintes liées à l'utilisation (résistance des matériaux, par exemple) et, bien entendu, le coût de fonctionnement, qui peut être un frein à l'utilisation de ces méthodes. La plupart des machines commercialisées pour l'I3D, excepté celles destinées à l'industrie lourde, sont modifiables. Certains plans d'appareils sont mêmes en accès libre et permettent une fabrication ou une adaptation sur-mesure. Cet aspect est important pour les laboratoires de recherche et développement qui peuvent ainsi transposer ou tester certaines de leurs applications. C'est notamment le cas de (Zeleny & Ruzicka, 2017) ou de (Demircan & Ozcelik, 2023) qui ont adapté un modèle d'imprimante commerciale pour imprimer des denrées alimentaires. (Demircan & Ozcelik, 2023) ont d'ailleurs conçu un dispositif et un mode d'utilisation destinés à transformer une imprimante FDM (*Fused Deposition Modeling*) polymère en une imprimante alimentaire à moindre coût.

Alors que des imprimantes 3D destinées à la fabrication métallique pour l'industrie peuvent coûter de 250 à 1000 k€ (Severini, Derossi & Azzollini, 2016), des imprimantes 3D « domestiques », offrant des performances tout-à-fait acceptables, sont désormais disponibles pour quelques centaines d'euros. Le coût du matériel n'est donc plus un frein et, un grand nombre d'applications peuvent être développées, moyennant parfois quelques adaptations. Par exemple, (Bégin-Drolet et al., 2017) ont développé une nouvelle tête d'impression pour fabriquer des structures en sucre. Dans leur étude, ces auteurs ont également utilisé un modèle mathématique pour prédire le diamètre des filaments, en fonction du débit d'alimentation et du taux d'extrusion.

Après avoir présenté succinctement l'I3D de façon générale et, l'I3D alimentaire en particulier, le présent chapitre reviendra plus largement sur la capacité d'adaptation de l'I3D et sur les modifications possibles des imprimantes 3D commerciales.

0.2. L'impression 3D, une technologie émergente et adaptable pour la conception et la fabrication d'aliments

Beaucoup d'aliments peuvent être imprimés, mais comme nous le verrons tout au long de ce mémoire, les difficultés inhérentes à l'I3D varient sensiblement en fonction de la composition macromoléculaire du produit et du procédé utilisé. Dans certains cas, l'utilisation d'additifs texturants est rendue obligatoire par le fait que les procédés d'impression ne sont

pas optimisés. L'aspect « texture » étant d'ailleurs un des principaux verrous dans ce type de technologie. En effet, dans le cas de l'I3D alimentaire, l'aliment et/ou les ingrédients sont d'abord déstructurés afin de passer dans un état semi-solide, avant d'être, le plus souvent, extrudés au travers d'une buse par l'intermédiaire d'un générateur de pression (piston ou vis-sans-fin), puis déposés sur un plateau (**Figure 0.1**). Ce dépôt se fait alors en suivant une géométrie préalablement définie dans un fichier numérique, ce qui va permettre d'assurer la restructuration macroscopique de l'aliment (Lipton, 2017; Mantihal, Prakash & B Bhandari, 2019).

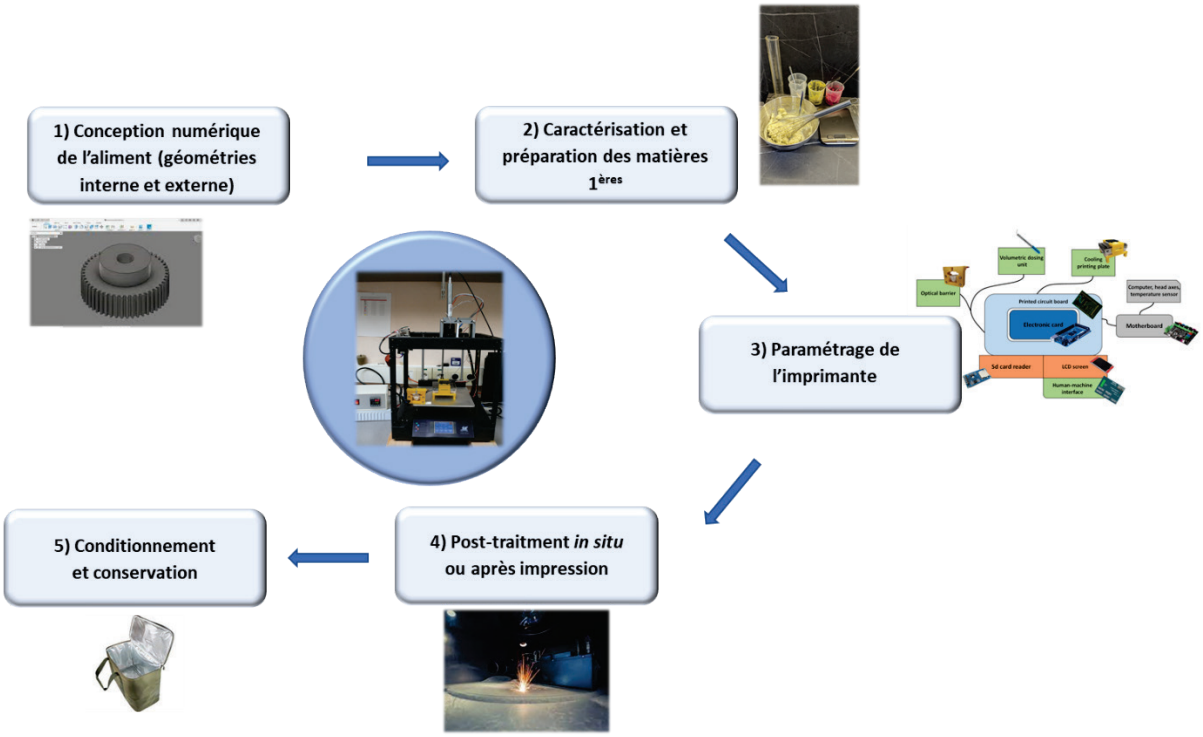


Figure 0.1. *Les 5 étapes inhérentes au procédé d'impression 3D alimentaire.*

Cependant, à l'échelle microscopique, les macromolécules d'intérêt vont subir un certain nombre de contraintes : mécaniques, comme le cisaillement (Iman Dankar, Pujolà, El Omar, Sepulcre & Haddarah, 2018), thermiques (Dick, Bhandari & Prakash, 2019a), et même chimiques (oxydations…), qui vont se traduire par une texture de l'aliment imprimé très différente de celle de la matière première. A l'heure actuelle, les effets des contraintes thermiques et chimiques appliquées à l'aliment en cours d'impression ont été peu étudiés, la plupart des études existantes portant sur l'effet d'un traitement thermique post-impression (Blutinger et al., 2021; Dick, Bhandari & Prakash, 2019b). Cependant, les effets des contraintes

mécaniques subies par les aliments imprimés sont plus largement documentés (Dankar et al., 2018). Parfois, la texture de l'aliment imprimé est similaire à celle de l'aliment conventionnel issu de la même matière première. C'est, par exemple, le cas des produits céréaliers ou la texture d'un cookie imprimé perçue par le consommateur est très proche de celle d'un cookie fabriqué traditionnellement (Kim, Lee, Park, Lee, Nguyen & Park, 2019). Par contre, la texture d'aliments plus élaborés, notamment, à partir de protéines animales, peut être sensiblement différente de celle de l'aliment traditionnel. Le principal avantage de l'I3D alimentaire réside, non pas, dans une production de masse d'aliments, mais dans une personnalisation de l'alimentation (Portanguen et al., 2019). Dans ce cas précis, une différence entre la texture finale de l'aliment imprimé et celle d'un aliment classique pourra ne plus être vue comme un inconvénient, mais plutôt comme une adaptation aux besoins du consommateur. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas des personnes souffrant de difficultés masticatoires, où la texture peut s'éloigner de l'aliment d'origine, tout en conservant des qualités nutritionnelles et organoleptiques optimales.

0.3. L'impression 3D alimentaire

Comme énoncé au début de ce chapitre, il existe un grand nombre de technologies d'I3D. Toutefois, pour l'I3D de produits biologiques, les trois techniques suivantes sont principalement utilisées : 1) l'extrusion qui est la plus répandue (Sun, Zhou, Yan, Huang & Lin, 2018) ; 2) le dépôt de gouttelettes (Singh, Haverinen, Dhagat & Jabbour, 2010) ; et 3) l'impression assistée par laser (Guillotin et al., 2010). A noter que les méthodes 2 et 3 trouvent essentiellement leurs applications en bio-impression (pour plus d'informations, se référer à l'**Annexe V 4**). La **Figure 0.2** schématise les principes de fonctionnement de ces trois méthodes.

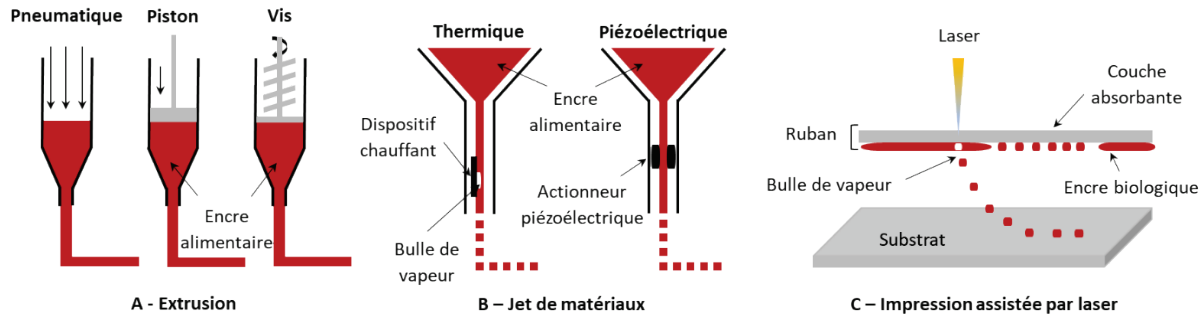


Figure 0.2. *Les principales techniques d'impression 3D applicables aux matériaux biologiques : A – Extrusion ; B – Dépôt de gouttelettes ou jet de matériau ; et C – Impression assistée par laser (d'après Portanguen et al., 2019).*

Pour rappel, un des objectifs de ce travail est de concevoir des aliments fonctionnels, en considérant l'aspect « naturalité » comme un facteur clé, ce qui implique que l'optimisation du procédé d'impression devient un objectif prioritaire et une composante majeure de nos travaux. Dans la littérature scientifique du domaine, il est possible de voir une tendance se dégager quant à l'utilisation des procédés d'I3D : l'aliment doit s'adapter au procédé et, non l'inverse (Portanguen et al., 2019; Yang, Tao, Wang, Xu & Zhu, 2022). Ce constat se traduit notamment par l'utilisation d'imprimantes 3D alimentaires commerciales, ou par la modification d'imprimantes non destinées initialement à l'alimentaire. Ces modifications ayant, la plupart du temps, pour seul objet de pouvoir extruder une matrice semi-solide. Or, il est possible d'aller plus loin dans le contrôle du procédé pour adapter la machine à l'aliment. C'est tout l'objet du **Chapitre 1** de ce mémoire.

Plusieurs dizaines d'imprimantes 3D alimentaires sont actuellement commercialisées (ChefJet de 3D Systems, Foodini de Natural Machines – **Figure 0.3**, Chef3D de BeeHex, *etc.*). Les coûts varient de quelques centaines à plusieurs milliers d'euros, selon leurs caractéristiques techniques. Leur usage est, toutefois, souvent restreint, car très orienté vers du design culinaire.

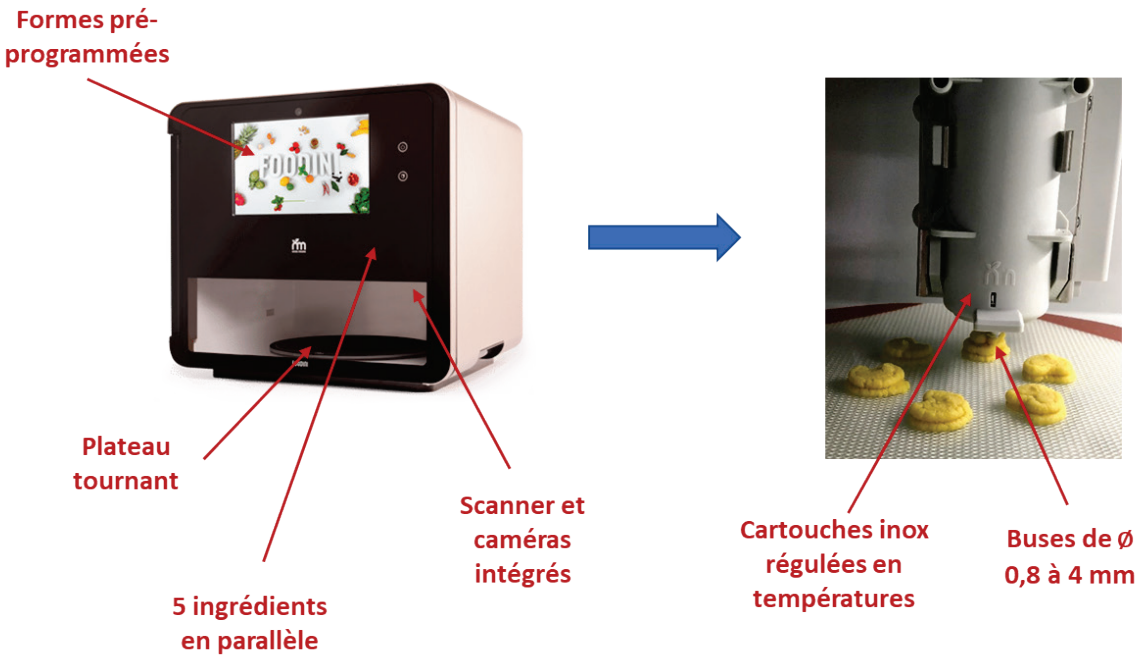


Figure 0.3. *Exemple d'une imprimante alimentaire 3D commerciale, la « Foodini » (Natural Machines, Espagne) : à gauche, une vue générale de la machine ; à droite, un exemple d'impression d'aliments (purée de légumineuses).*

Néanmoins, ces machines commencent à être utilisées dans de nombreux travaux de laboratoire, par exemple, pour déterminer les propriétés rhéologiques ou d'écoulement de matrices alimentaires (chocolat, pâtes…), ou pour étudier la correspondance entre la géométrie d'un aliment imprimé et la géométrie originale prédéfinie dans le modèle numérique (Kousani et al., 2017; Mantihal, Prakash, Godoi & Bhandari, 2017; Zhao, Wang, Ren, Li, Yang & Jin, 2018). La gamme des imprimantes alimentaires s'est étendue aux machines multi-ingrédients, qui permettent d'imprimer des aliments plus élaborés. Cependant, ce type de machine ne permet pas d'assurer un régime alimentaire équilibré aux utilisateurs, car certains aliments ne sont pas imprimables (ou très difficilement), comme les produits carnés ou la plupart des fruits et légumes (Lv, Lv, Li & Zhong, 2023). Seuls les produits à faible point de fusion, riches en polysaccharides ou naturellement gélifiants, peuvent être facilement imprimés, comme : le chocolat, la pâte à biscuits, les produits laitiers ou céréaliers, *etc.* Pour personnaliser l'alimentation et concevoir des aliments fonctionnels d'intérêt nutritionnel à base de protéines d'origine carnée et/ou d'extraits de plantes, les machines *ad hoc* ne sont donc pas encore totalement au point. Néanmoins, certaines études (Bégin-Drolet et al., 2017; Diañez et al., 2019; Zeleny & Ruzicka, 2017) ont porté sur le développement ou la modification

de prototypes pour l'impression d'un produit spécifique mono ou multi-ingrédients, mais là encore, le plus souvent d'origine végétale (glucides, chocolat, pâtes…). L'une des principales difficultés réside dans le contrôle de la quantité de matrice déposée en fonction de la vitesse de déplacement de la tête d'impression.

Les imprimantes 3D classiques (notamment de type FDM) présentent l'avantage d'être facilement modifiables et adaptables aux contraintes des matrices alimentaires à imprimer. Certaines d'entre elles sont peu coûteuses et *open-source*, c'est-à-dire que leur code de programmation est disponible et, donc modifiable. Ceci explique pourquoi la plupart des travaux de laboratoire sont réalisés avec ce type de machine. Ces imprimantes sont le plus souvent conçues sur le modèle d'un système de pression constitué d'un entraîneur de filament, ou d'un contenant, dont la compression est assurée par une action mécanique (vis sans fin, piston entraîné par un engrenage) ou pneumatique (piston). Ces systèmes permettent de délivrer une quantité déterminée d'encre alimentaire semi-visqueuse au travers une buse ou d'une aiguille, tout en contrôlant la vitesse de déplacement et le taux d'extrusion. La régulation de température au niveau de la tête d'impression ou du plateau n'est pas toujours réalisée. Les modifications apportées par les utilisateurs se situent donc principalement au niveau de la tête d'impression, où le système d'extrusion est souvent remplacé par un pousse-seringue (Vancauwenberghe, Verboven, Lammertyn & Nicolaï, 2018).

Les machines à vocation alimentaire actuellement commercialisées, le plus souvent conçues pour le grand public, semblent incompatibles avec une maîtrise globale du procédé, que nous considérons pourtant comme essentielle. C'est notamment le cas avec la régulation de la température au niveau du produit à imprimer. Ces systèmes sont généralement basés sur la réponse d'un capteur de température de type thermocouple placé au niveau du boîtier qui accueille la cartouche contenant le produit. Cela présente deux inconvénients majeurs : 1) l'emplacement du capteur est éloigné du cœur de la cartouche, dont le diamètre peut être de plusieurs dizaines de millimètres ; et 2) les cartouches sont obligatoirement en acier inoxydable 316L (contact alimentaire), qui possède une conductivité thermique (λ) de 15 $W.m^{-1}. K^{-1}$, plutôt faible, comparé, par exemple, à celle de l'aluminium (237 $W.m^{-1}. K^{-1}$). Ces deux contraintes combinées empêchent de connaître et de réguler précisément la température du matériau alimentaire avant l'impression, à moins qu'il ne soit placé dans la cartouche et dans l'imprimante plusieurs dizaines de minutes avant l'extrusion. Un temps

aussi important peut aussi être source de détériorations du produit (dénaturation des protéines, oxydations…).

La littérature fournit des données abondantes concernant les réglages d'impression dans le cas de différentes matrices (**Tableau 0.2**), montrant que la température à laquelle l'impression a lieu est d'une grande importance, notamment au vu de la relation entre celle-ci et la vitesse d'écoulement (Rando & Ramaioli, 2021). Le contrôle de la régulation thermique sera d'autant plus crucial si la production est destinée à se faire à grande échelle, avec un objectif de standardisation des aliments imprimés (Dick et al., 2019a).

Les produits carnés sont peu adaptés à l'I3D alimentaire (Dong, Wang, Yang & Xu, 2023). L'absence de polysaccharides dans leur matrice ne favorise pas la prise en masse et, la capacité de gélification des protéines musculaires est limitée par les conditions physico-chimiques de la matière première (force ionique, température, *etc.*) (Wang, Zhang, Bhandari & Yang, 2018). A l'exception des travaux de Yang et al. (2022) qui ont imprimé de la viande de poulet en présence de NaCl, toutes les études actuellement publiées sur les produits carnés ont utilisé des additifs texturants pour assurer l'imprimabilité de la matrice. Afin d'éviter un excès de formulation de l'aliment imprimé, il est nécessaire de maîtriser le procédé d'impression à plusieurs niveaux : contrôle des mouvements de la tête d'impression et du débit d'extrusion de l'encre alimentaire, contrôle des températures pendant l'impression par régulation chaude au niveau de la tête d'impression, mais surtout par régulation froide au niveau du plateau d'impression. Ce dernier point constituant un apport original à la littérature du domaine (*cf*. **Chapitre 1**).

Tableau 0.2. *Principales méthodes d'impression 3D alimentaires : technologies utilisées et paramètres de fonctionnement associés en fonction du type d'aliments. Seules les études comportant des données chiffrées sont présentées.*

Technologie d'impression	Type d'aliment	Vitesse impression ($mm.s^{-1}$)	Vitesse déplacement ($mm.s^{-1}$)	Débit extrusion ($mL.min^{-1}$)	Diamètre buse (mm)	Taux de remplissage (%)	Epaisseur couche (mm)	Références
Seringue inox (1,3 bars)	Mélange fruits/légumes + collagène de poisson	11-21	20	/	1,2	25	1,1	Severini, Derossi, Ricci, Caporizzi & Fiore, 201)
Extrusion coaxiale	Pectine/$CaCl_2$	10	200	0,34	0,838	85	0,838	Vancauwenberghe et al., 2018
Seringue	Purée pomme de terre/jus de fraise gélifié	25	/	/	/	40-100	1,2	Kim, Bae & Park, 2018
	Aliments divers (viscosité $1,1.10^3$ à 10^3 Pa.s)	15-20	15-20	/	/	/	/	Fanli Yang, Zhang, Bhandari & Liu, 2018
	Glucides	20-50	/	/	1	/	/	Bégin-Drolet et al., 2017
Piston (0,4 MPa)	Pâte de céréales	30	50	/	0,6	10-20	0,3-0,5	Severini et al., 2016
Mélangeur à vis sans fin + convoyeur	Jus citron gélifié + amidon	30	/	1,44	1	/	/	Fanli Yang et al., 2018
	Surimi	28	/	0,18	2	/	/	Wang et al., 2018

0.4. Impact du procédé d'impression sur les aliments

Selon Le Tohic et al. (2018), pendant un procédé d'I3D, le produit est soumis à deux types de contraintes : 1) un traitement thermique correspondant à l'agrégation des protéines et à la fusion des lipides du produit et, 2) un cisaillement lors de l'extrusion au travers de la buse. Le procédé va donc avoir un ou des effet(s) sur la structure des macromolécules constituantes du produit alimentaire et modifier, en retour, les propriétés de ce dernier. La plupart des études portant sur des applications d'I3D, se sont focalisées sur « l'imprimabilité » qui, selon Godoi et al. (2016) se définit comme étant « l'ensemble des propriétés permettant aux produits d'avoir une stabilité dimensionnelle suffisante pour supporter leur propre poids ».

0.4.1. Les aliments d'origine végétale

Les aliments d'origine végétale sont divisés en deux catégories : les légumes/produits céréaliers et les produits de confiserie. Ces derniers ont, d'ailleurs, été les premiers à avoir été étudiés, ce qui s'explique par le principe même de l'I3D alimentaire, à savoir, dans un premier temps, déstructurer la matière, pour ensuite la restructurer. Cette dernière étape étant la plus délicate, cela explique pourquoi des produits à bas point de fusion, à cristallisation rapide à basse température ou riches en amidon, ont tendance à avoir une imprimabilité accrue et une texture facilement reconnaissable par le consommateur. Selon Masbernat (2021), les farines céréalières sont largement utilisées dans la composition des aliments imprimés en 3D, avec un ratio farine/eau qui impacte directement les propriétés d'imprimabilité du matériau.

Cependant, il est quand même parfois nécessaire de modifier, en amont, la formulation de certains produits, à l'image des travaux sur le chocolat de Mantihal et al. (2017) ; Mantihal et al. (2019). En effet, bien que le chocolat présente l'avantage de pouvoir être extrudé à basse température (32 °C, pour une fusion du produit comprise entre 28 et 30 °C) et de prendre en masse à température ambiante (20-25 °C), ces auteurs ont ajouté des additifs pour améliorer l'imprimabilité de ce matériau, comme du stéarate de magnésium, à hauteur de 5 %, ou des stérols végétaux, à hauteur de 3 %. Ces ajouts avaient pour objectif, en facilitant la lubrification, d'améliorer l'efficacité de l'écoulement lors du dépôt. A ce stade, il est possible de raisonnablement se poser la question de l'intérêt de l'I3D alimentaire, s'il est nécessaire de complexifier la formulation d'un aliment pour pouvoir l'imprimer, et

ce, sans pour autant réussir à obtenir les mêmes propriétés que l'aliment d'origine. En effet, comme l'ont montré Mantihal, Prakash & Bhandari (2019), le motif de remplissage (le plus utilisé, car le plus efficace, est structuré en étoile ou en nid d'abeille) et le taux de remplissage conditionnent grandement la résistance mécanique de la structure imprimée ; néanmoins, cette dernière reste plus fragile (de 20 %), qu'un chocolat coulé de manière classique, en couches ne contenant pas d'espace vide. Dans le cas de produits de confiserie comme le chocolat, changer la géométrie interne et/ou externe peut éventuellement apporter une plus-value au produit, notamment en termes de sensation en bouche. Cependant, nous pensons qu'il serait plus judicieux d'arriver à ce résultat, en travaillant uniquement sur le procédé d'impression, sans avoir à changer la formulation de l'aliment. Au lieu de travailler directement à partir de chocolat brut, Karyappa & Hashimoto (2019) ont eu l'idée d'utiliser un mélange composé de pâte à tartiner, de poudre de cacao et de sirop de chocolat. Cette formulation, certes éloignée d'un chocolat classique, a le mérite de n'utiliser aucun additif, hormis ceux contenus dans les matières premières d'origine et, de s'effectuer à température ambiante. C'est la proportion de poudre de cacao (entre 5 et 25 % en masse) qui permet de fixer les propriétés rhéologiques (limite d'élasticité et module de conservation G'[4]), qui constituent le premier élément à optimiser pour l'impression. Le deuxième élément se situe au niveau du système de distribution du produit, soit l'ensemble constitué du générateur de pression, de la seringue et de la buse. C'est à ce niveau que va être déterminé le débit massique (rapport entre la chute de pression dans la seringue et le diamètre de la buse) et, où la matrice subira le plus de contraintes de cisaillement (buse). Enfin, le troisième élément est la vitesse de déplacement de la tête d'impression qui va conditionner la quantité de matière déposée par unité de longueur, ainsi que le pas vertical entre deux couches adjacentes.

Concernant les autres aliments d'origine végétale, riches en amidon, comme les produits céréaliers et les purées de légumes, notamment à base de pomme de terre, à l'instar des travaux de Karyappa & Hashimoto (2019) sur le chocolat, Liu, Liang, Saeed, Lan & Qin (2019) ont aussi montré l'importance de la formulation et des paramètres du procédé sur les propriétés d'impression de ce type de produit. Après de nombreux essais, les auteurs ont conclu qu'une formulation quaternaire composée de farine de blé, de poudre de mangue lyophilisée, d'huile d'olive et d'eau, avec des proportions massiques respectives de 57.5:2.5:3.5:30 et, utilisée dans les conditions opératoires suivantes : pression à 600 kPa, vitesse de 6 $mm.s^{-1}$, diamètre de buse de 0,58 mm et taux de remplissage à 50 %, permettait d'obtenir la meilleure qualité d'impression. Cependant, de manière

[4] Ces termes seront définis dans les Chapitres 2 et 3.

contre-intuitive, le fait d'augmenter les pourcentages massiques des différents ingrédients riches en amidon avait affecté négativement la capacité d'extrusion du matériau. Ceci a d'ailleurs aussi été montré par (Liu, Zhang, Bhandari & Yang, 2018). En effet, dans le cas de l'impression d'une purée de pomme de terre, la concentration en amidon avait conditionné l'imprimabilité du matériau (**Figure 0.4**). Un travail similaire de mise au point de formulation a été conduit sur de la pâte à pain (Yang, Zhang, Prakash & Liu, 2018). Dans cette étude, le même phénomène de rupture de continuité lors de l'extrusion a été observé, dès que les concentrations massiques en saccharose et farine atteignaient un certain seuil. Il convient, cependant, de noter que, dans ces dernières études mentionnées, la présence d'un ingrédient lubrifiant (huile, beurre…) semble, à chaque fois, nécessaire pour obtenir une extrusion correcte de la matière à imprimer.

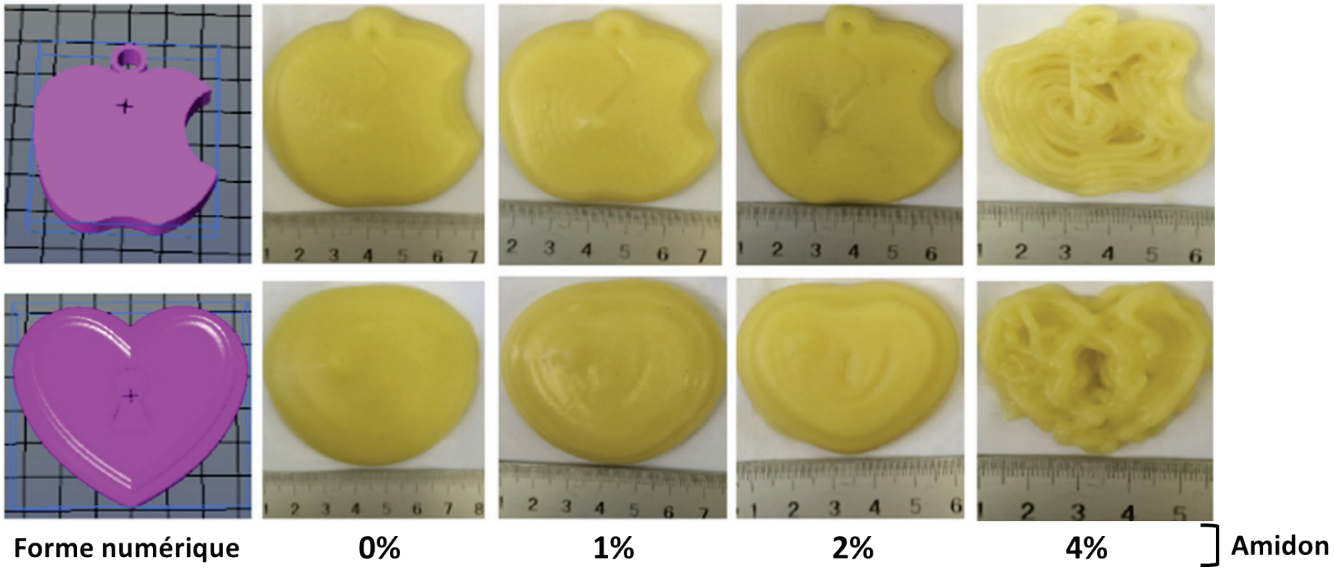


Figure 0.4. *Effet de l'ajout d'amidon sur l'imprimabilité de purée de pomme de terre (d'après Liu et al., 2018).*

0.4.2. Les aliments d'origine animale

Les produits d'origine animale ne font pas l'objet d'autant de travaux en matière d'I3D alimentaire que les produits d'origine végétale, probablement à cause d'une imprimabilité rendue délicate du fait de l'absence de glucides. Néanmoins, parmi les études existantes, trois grandes familles de produits animaux ont été plus particulièrement étudiées : les viandes et produits de la mer, les produits laitiers de type fromage et les ovoproduits, par ordre décroissant du nombre d'articles publiés. Cette section a pour but de faire le point sur les verrous et les limites existants quant à

l'impression de ces catégories d'aliments.

0.1.1.1. Les produits carnés

Parmi les produits animaux, les produits carnés sont probablement ceux qui présentent le plus de difficultés lors de la phase d'impression (Dong et al., 2023), ce qui explique le recours à des additifs texturants. Un exemple d'I3D de viande a été relaté par Dick et al. (2019a) (**Figure 0.5**). Dans leur étude, ces auteurs ont imprimé un aliment à partir de deux ingrédients distincts : de la viande de bœuf maigre (contenant moins de 5 % de matière grasse) et de la matière grasse ajoutée, afin de reconstituer et d'imprimer un aliment ressemblant à un steak haché. Le travail de déstructuration de la viande a été fait mécaniquement jusqu'à obtenir une pâte imprimable semblable à une émulsion. Cette émulsion contenait au final 85 % de viande, 14 % d'eau, 0,5 % de chlorure de sodium (NaCl) et 0,5 % de gomme de guar.

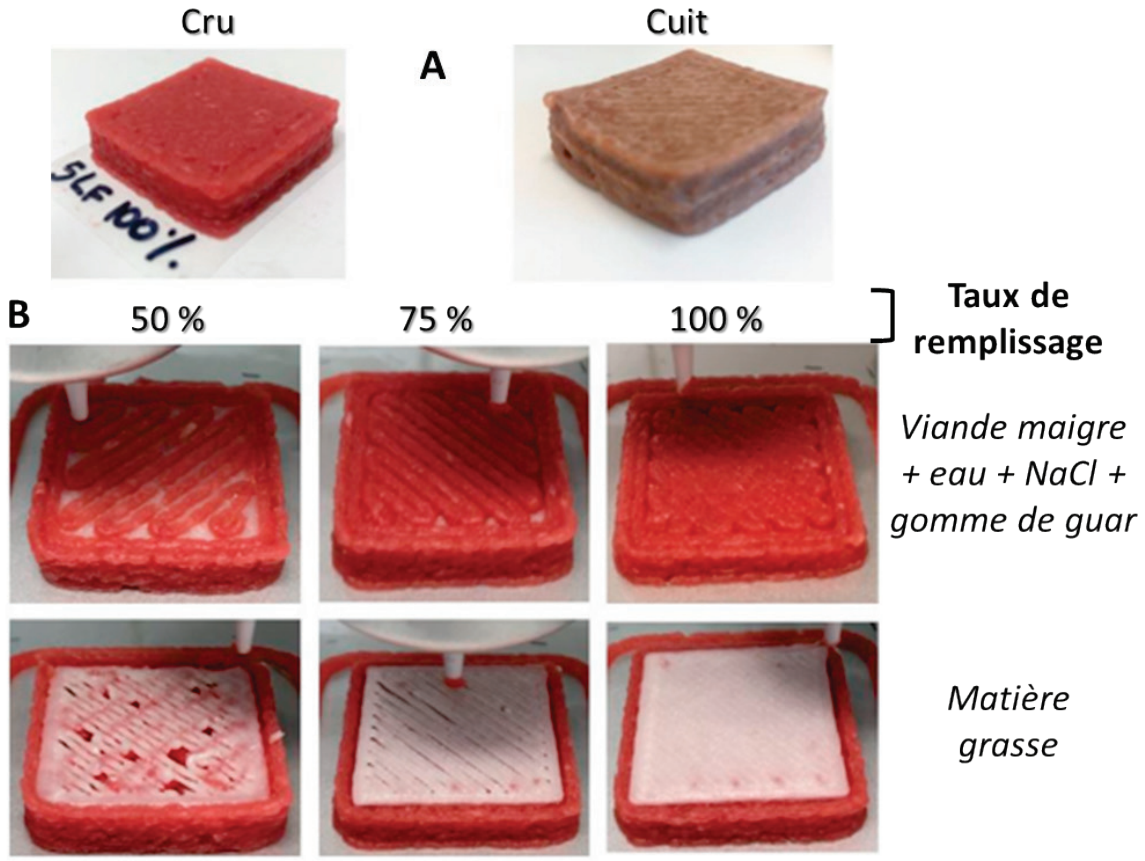


Figure 0.5. *Modèles de viande composite multicouche imprimés en 3D : A - échantillons cru (à gauche) et cuit (à droite) ; B - Dépôt de filament d'une formulation à base de viande et de matière grasse selon trois taux de remplissage, réalisé avec des buses de diamètre 2 mm pour la viande et de 1 mm pour la matière grasse (d'après Dick et al., 2019b).*

D'après les travaux de Wang et al. (2018), le NaCl, en favorisant la solubilisation des protéines myofibrillaires, a permis, par des liaisons de faible énergie, la stabilisation d'une pâte de surimi. Les résultats ont montré que l'impression était possible, ainsi qu'un post-traitement thermique. Comparativement au témoin, l'ajout de 1,5 % de NaCl a doublé la force du gel, qui a atteint 7,2 N. Cette résistance accrue du gel est susceptible de favoriser son imprimabilité. L'augmentation de la concentration en sel a aussi conduit à une diminution de la viscosité du surimi. Ceci est également confirmé par les propriétés viscoélastiques de ce matériau : le module de conservation G' est supérieur au module de perte G'' dans la région viscoélastique linéaire, suggérant ainsi un potentiel pour former un gel élastique, ou une structure semblable à un gel. La diminution continue et significative de ces deux modules, en fonction de l'augmentation de la concentration en sel (jusqu'à 1,5 %), pourrait s'expliquer par une redistribution des forces inter- et intramoléculaires au niveau des queues de chaines de myosine (méromyosine légère). La composante élastique (G') de la structure pré-gélifiée a été affaiblie et la fluidité du surimi a augmenté (Wang et al., 2018). Finalement, que ce soit pour des produits de la mer ou de la viande, des additifs sont utilisés pour faciliter l'impression des aliments et la préservation de leur géométrie, en fin d'impression ou après l'étape de cuisson. Parmi les additifs les plus couramment utilisés, il convient de citer une enzyme, la transglutaminase (Lipton et al., 2015) et différents gélifiants d'origine végétale ou dérivés d'algues, comme les gommes de guar et de xanthane, l'agar-agar, les alginates, le glycérol, les lécithines, *etc*. Les différents additifs cités, à l'exception de la transglutaminase, peuvent également être utilisés pour l'I3D d'aliments autres que carnés. Cependant, certaines législations n'autorisent pas l'utilisation de tous ces additifs, c'est notamment le cas en France pour la transglutaminase. Cette enzyme est utilisée afin d'obtenir des géométries complexes à base de produits carnés. Elle permet de générer de nouvelles matrices protéiques en créant des liaisons covalentes entre des résidus Lysine et Glutamine, lors d'une réaction calcium dépendante. Ce processus permet donc de créer des liaisons covalentes entre les protéines présentes dans les purées à base de produits carnés, créant des hydrogels autoportants. Cependant, l'utilisation d'additifs tels que la transglutaminase, bien que très intéressante du point de vue des effets sur les propriétés mécaniques résultantes, est en contradiction avec la tendance actuelle d'un retour à plus de naturalité des aliments. Aussi, un produit développé par I3D pourrait être mal accueilli par les consommateurs (Godoi et al., 2016; Lipton et al., 2015). L'utilisation de ces additifs reste, aujourd'hui, indispensable à l'impression de la plupart des aliments pauvres en glucides (Zhao, Zhang, Chitrakar & Adhikari, 2020). Cependant, des solutions technologiques alternatives pouvant améliorer la texture des aliments carnés imprimés peuvent être mises en œuvre, sans avoir recours à ces additifs.

Une première solution très simple consisterait à élaborer des aliments associant des produits animaux avec des produits végétaux riches en glucides. Cela permettrait aussi de varier les sources de protéines, ce qui est intéressant sur le plan nutritionnel et au niveau de la durabilité du procédé. A notre connaissance, les études portant sur ce type d'aliments mixtes (ou hybrides) restent rares. D'ailleurs, les revues de synthèse de Perez, Nykvist, Brogger, Larsen & Falkeborg (2019) et de Portanguen et al. (2019), bien qu'explorant les propriétés d'imprimabilité des principales macromolécules telles que les protéines, les glucides et les lipides, ne traitent pas de cet aspect. Toutefois, des travaux très récents ont montré que l'I3D d'aliments mixtes était possible et intéressante pour concevoir un aliment fonctionnel. En effet, l'association d'une légumineuse (lentille corail) avec des abats (mélange de foies de volaille et de porc), a permis la conception d'un aliment hybride, riche en protéines, qui permet d'apporter du fer sous forme assimilable à l'organisme, tout en valorisant des co-produits animaux (Schiell, Portanguen, Scislowski, Astruc & Mirade, 2023).

L'exploitation du potentiel gélifiant des protéines myofibrillaires pourrait aussi être mise à profit et constituer une solution alternative. En effet, l'extraction d'actine et, surtout, de myosine issue de bas-morceaux ou de coproduits animaux pourrait s'avérer prometteuse, à condition de maitriser cette étape longue et fastidieuse, qui nécessite d'utiliser un certain nombre de solvants ioniques. De plus, les rendements sont souvent très faibles et donc incompatibles avec une utilisation à grande échelle dans le secteur agro-alimentaire. A ceci s'ajoute également l'application de barèmes thermiques nécessaires à la gélification, qui peuvent s'avérer néfastes pour les qualités organoleptiques ou nutritionnelles du produit final, et ce, sans compter l'impact énergétique de telles opérations unitaires.

Une troisième solution consiste à utiliser la capacité qu'ont les résidus d'acides aminés libres des protéines à se lier, par des liaisons covalentes, à des glucides réducteurs lors des premiers stades des réactions de Maillard (réaction de glycation). La complexité de cette approche réside dans le nombre important de paramètres à maîtriser pour contrôler la réaction (nature de la matière première, type et concentration du glucide, temps de réaction, température, pH, activité de l'eau…) afin, d'une part, qu'elle puisse produire les effets escomptés, et afin, d'autre part, de stopper la réaction avant que des composés du type *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) néfastes pour la santé humaine n'apparaissent (Nooshkam, Varidi & Verma, 2020; Stevenson, Long, Seyfoddin, Guerrero, de la Caba, & Etxabide, 2020). Ce point particulier a fait l'objet de travaux spécifiques, dont les principaux résultats sont présentés dans le **Chapitre 2** de ce mémoire.

Enfin, une dernière solution, basée sur la maîtrise complète du procédé d'impression, permettrait de s'affranchir de l'utilisation d'additifs texturants, tout en garantissant une texturation

optimale des produits imprimés. De façon à éviter la solution de facilité qui consiste à employer ce type d'additifs, cette approche requiert donc le développement d'imprimantes alimentaires *ad hoc*, de façon à adapter le procédé à l'aliment, et non l'inverse. C'est tout l'objet d'une partie des travaux conduits dans cette thèse qui sont présentés dans le **Chapitre 1** de ce mémoire et dans l'article de (Portanguen et al., 2022).

0.1.1.2. Les produits laitiers

Pour expliquer le peu d'études existantes concernant l'I3D de produits laitiers, il est légitime de s'interroger sur la pertinence de concevoir de tels aliments par ce procédé. En effet, les propriétés gélifiantes des produits laitiers (yoghourts, fromages) sont bien connues et maîtrisées depuis des siècles. Leur texture, souvent souple, les rend facilement consommables par tout un chacun. L'intérêt ne réside pas non plus dans les nouvelles formes, car celles-ci sont faciles à obtenir par simple moulage. L'intérêt ne peut résider que dans le principal argument qui est souvent mis en avant concernant l'I3D alimentaire, celui de la nutrition personnalisée. Cette hypothèse a été émise dans les travaux de Liu, Liu, Wei, Ma, Bhandari & Zhou (2018) visant à concevoir des aliments enrichis en protéines de lactosérum, qui permettraient de valoriser ce co-produit de l'industrie laitière, même si ce point n'a pas été avancé par les auteurs. D'un point de vue plus technique, les produits laitiers présentent certaines prédispositions à l'I3D, en lien avec la vitesse d'impression, la température et leur teneur en matière grasse, comme l'ont montré dans leurs travaux (Le Tohic et al., 2018; Lille, Nurmela, Nordlund, Metsä-Kortelainen & Sozer, 2018; Liu, Yu, Liu, Regenstein, Liu & Zhou, 2019) (*cf*. section 0.5.2). En effet, Liu al. (2019), en étudiant la structure de gels à base de protéines de lait, ont montré que l'augmentation de la teneur en protéines dans le milieu permettait de passer d'un état enchevêtré à un réseau 3D présentant de meilleures caractéristiques d'imprimabilité. A partir de poudre de lait dont la concentration pouvait aller jusqu'à 75 % en masse, Lee, Karyappa & Hashimoto (2020) ont réussi à imprimer, sans utiliser d'additif, des structures 3D constituées de plusieurs matériaux et composées d'une structure externe à base de lait et d'un fourrage à base de différents sirops (chocolat, myrtille, crème et érable). Pour cela, la technologie utilisée était celle de l'extrusion à froid par *Direct Ink Writing* (DIW). Concrètement, selon Lee et al. (2020) et Yun, Han, An, Jung, Kim & Lee (2022), afin d'assurer une imprimabilité correcte, la formulation doit répondre à deux caractéristiques essentielles : 1) présenter un comportement d'amincissement lors du cisaillement et, 2) conserver sa forme lors du dépôt. Pour ce faire, l'encre alimentaire utilisée doit avoir une limite d'élasticité et un module de conservation (G') élevés. Le taux optimal de poudre de lait, déterminé par

l'étude, était de 70 %, conduisant à une encre moins visqueuse et nécessitant moins de pression à l'extrusion qu'une formulation en contenant 75 % (Lee et al., 2020).

Il s'avère donc que la plupart des études citées dans cette section ont pour point commun de ne pas travailler sur la matière première brute, mais sur des formulations concentrées, mettant donc en évidence l'intérêt limité d'utiliser l'I3D pour concevoir de nouveaux produits laitiers, même si des résultats novateurs ont été obtenus par (Lee et al., 2020).

0.1.1.3. Les ovoproduits

A l'instar des produits laitiers, l'I3D d'ovoproduits a été relativement peu étudiée. Citons, néanmoins, les travaux de Anukiruthika, Moses & Anandharamakrishnan (2020), portant sur un produit hybride composé de jaune ou de blanc d'œuf et de farine de riz et, dont l'objectif était de déterminer les paramètres optimaux d'impression. Il est ressorti de cette étude que le jaune et le blanc d'œuf n'étaient pas imprimables sous leur forme native et, qu'il était indispensable d'ajouter de la farine de riz (soit de l'amidon) pour améliorer la stabilité et la résistance de la matrice imprimée sur les plans texturaux et rhéologiques. De plus, il est également apparu que le jaune d'œuf était plus adapté à l'impression que le blanc. La viscosité maximale du blanc natif a été divisée par un facteur 2 après ajout de farine de riz, alors que celle du jaune a été multipliée par un facteur 1,5 à 3. Cette propriété serait attribuable à une capacité accrue des protéines du jaune d'œuf à interagir avec l'amidon. A noter que le jaune contient aussi plus de lipides que le blanc et, que ces derniers peuvent jouer un rôle de plastifiant et de lubrifiant. Cette tendance à complexifier la formulation pour obtenir une impression correcte a été également au cœur des travaux de Liu, Meng, Dai, Chen & Zhu (2019). Cette fois, des protéines de blanc d'œuf ont été associées à de la gélatine, de l'amidon de maïs et du sucrose pour améliorer les propriétés rhéologiques lors de l'impression. La géométrie et la stabilité de la structure ont été assurées par un paramétrage précis de l'imprimante : diamètre de buse de 1 mm, vitesse de déplacement de 70 $mm.s^{-1}$ et un débit de 0,004 $cm^3.s^{-1}$.

Les ovoproduits et les produits laitiers ont donc en commun le fait d'être difficilement utilisables sous leur forme native. La tendance majoritaire dans les laboratoires est donc de travailler sur la formulation pour améliorer l'imprimabilité. Néanmoins, comme déjà mentionné dans ce chapitre, la demande actuelle des consommateurs va vers plus de naturalité, donc vers le bannissement des additifs. L'adaptation et la maîtrise du procédé au produit devient alors fondamentale, comme l'ont montré (Xu et al., 2020). Dans leur étude, en investiguant différents traitements thermiques appliqués à du jaune d'œuf, ces auteurs ont montré que des barèmes de chauffage de 76 °C, pendant 8 et 10

min, ou 80 °C pendant 6 min, permettaient une extrusion aisée, mais aussi une adhésion correcte entre les couches, assurant ainsi le maintien de la forme après impression. A notre connaissance, ces travaux constituent l'une des premières études publiées mettant en avant l'adaptation du procédé au cœur de la problématique d'I3D alimentaire.

A ce stade, il convient de faire un point sur l'utilisation des hydrocolloïdes, en tant qu'additifs texturants. En effet, ceux-ci sont largement utilisés, aussi bien lors de l'impression de produits d'origine animale que végétale. En effet, la présence d'hydrocolloïdes facilite grandement le dépôt et la cohésion des couches et exerce une influence positive sur la stabilité dimensionnelle (Kim et al., 2018). Leur utilisation constitue donc une alternative simple et peu coûteuse permettant de pallier les défauts de texture. Comme le soulignent Godoi, Bhandari, Prakash & Zhang (2019), une formulation maîtrisée en hydrocolloïdes permet de mimer la sensation en bouche d'aliments existants, ainsi que le goût, du fait de l'ajout d'agents de flaveur. Par exemple, 4 % de gomme de xanthane offrent la même sensation en bouche que de la purée de pommes de terre, et 4 % de gomme de xanthane associés à 1 % de gélatine permettent d'obtenir une texture semblable à celle de la tomate. Une approche identique a été utilisée lors du projet Européen : PERFORMANCE (*Personalised Food Using Rapid Manufacturing for the Nutrition of Elderly Consumers)* (Lipton et al., 2015; Liu, Zhang, Bhandari & Wang, 2017). Ce projet avait pour objectif, *via* l'I3D, de développer des aliments attractifs destinés aux séniors, en recréant des formes alimentaires connues, dont la texture était telle que ces aliments pouvaient être facilement ingérés. La contrepartie de ces expérimentations, axées sur l'acceptabilité visuelle, était l'utilisation massive d'hydrocolloïdes, dont la proportion pouvait atteindre jusqu'à 60 à 80 % de la composition de l'aliment.

Bien que la présence d'hydrocolloïdes dans un aliment ne constitue pas en soi un problème, car ils sont autorisés en alimentation humaine, ils sont néanmoins, dans l'esprit des consommateurs, souvent associés à l'ultra-transformation des aliments. Outre le fait que cela pourrait conduire à un rejet des produits contenant des hydrocolloïdes, leur utilisation, sur le plan technique et scientifique, constitue une solution de facilité qui limite le recours à des solutions plus naturelles.

0.5. Impact du procédé d'impression sur les macromolécules de l'aliment

0.5.1. Impact sur les protéines

Il a été indiqué précédemment que peu de produits riches en protéines d'origine animale ont été étudiés en vue d'applications en I3D. Citons, quand même quelques travaux qui se sont intéressés à des purées de différents types de viande (Lipton et al., 2015), au collagène (Inzana et al., 2014) et à la gélatine (Farag & Yun, 2014). Néanmoins, certaines études, comme celle de (Wang et al., 2018), nous renseignent sur les difficultés inhérentes à ce genre de matrices. En fait, le seul produit d'origine animale qui peut prétendre à être imprimé en 3D, sans ajout d'additif, est le surimi, car cet aliment, déjà transformé en amont, contient environ 7 % de glucides (ajoutés sous forme d'amidon) et 1,5 % de NaCl, ce qui favorise grandement son imprimabilité. Ces résultats sont en accord avec ceux de Severini & Derossi (2016), qui ont constaté une meilleure imprimabilité de préparations à base de viande de bœuf, lorsque les protéines myofibrillaires étaient solubilisées consécutivement à l'ajout de NaCl (**Figure 0.6**). Les observations en microscopie électronique de Wang et al. (2018) ont montré qu'effectivement, l'addition de NaCl avait entraîné des réticulations au niveau des protéines myofibrillaires, en permettant la liaison d'acides aminés libres aux protéines, en réduisant les espaces vides et en transformant la structure globale du gel en un réseau à brins fins. Cet effet restant maximal et constant jusqu'à l'ajout de 1,0 g NaCl/100 g de surimi. L'impression de protéines est donc régie par les propriétés de ces dernières et, notamment par leur agrégation, qui elle-même dépend du point isoélectrique (pI). Godoi et al. (2016) ont suggéré qu'il serait possible de créer de nouvelles textures en intercalant des couches de protéines alimentaires avec des couches de polysaccharides (par exemple, des alginates), ou en appliquant un stress thermique ou mécanique, ou en utilisant des ingrédients acides ou basiques pendant le procédé d'I3D, de façon à agir sur l'agrégation.

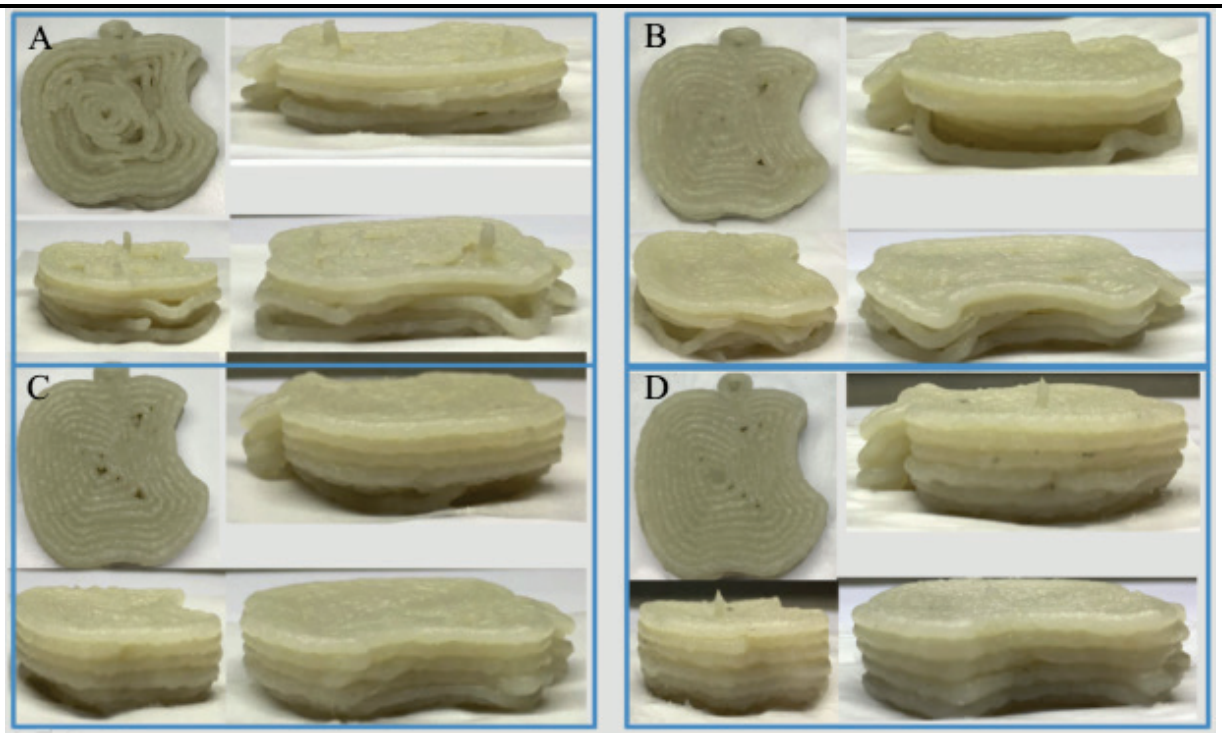


Figure 0.6. *Effet de l'ajout de sel sur l'imprimabilité d'une pâte de surimi : A – aucun ajout ; B – ajout de 0,5 g NaCl/100 g de surimi ; C – ajout de 1,0 g de NaCl/100 g de surimi ; et D – ajout de 1,5 g de NaCl/100 g de surimi (d'après Wang et al., 2018).*

Les principales protéines de structure (collagène, élastine et fibrine) ont déjà fait l'objet d'études, dans le domaine biomédical, en vue de fabriquer des supports (*scaffolds*) à architecture complexe, pour notamment, effectuer du dépôt de cellules. L'organisation de ces protéines, sous forme fibreuse, avec notamment des contraintes d'alignement, de diamètre ou de porosité, varie en fonction du type de tissu et influence grandement leurs propriétés mécaniques. La fibrine, protéine naturellement fabriquée par l'organisme, est utilisée pour réparer des lésions et peut être imprimée sous forme de gel (Chia & Wu, 2015; Melchels, Domingos, Klein, Malda, Bartolo & Hutmacher, 2012). Elle est notamment utilisée en I3D pour la fabrication de supports (*scaffolds)* afin de réparer les os, les neurones ou les valvules cardiaques (Munaz, Vadivelu, St. John, Barton, Kamble & Nguyen, 2016). Concernant le collagène, qui est la protéine la plus abondante chez les mammifères, son impression se fait sous forme de gel, après extraction et digestion enzymatique. Les concentrations des solutions imprimables à base de collagène varient selon les études de 0,2 à 20 $mg.mL^{-1}$, en solution tampon et à force ionique ajustée. Le choix de la concentration va dépendre des propriétés mécaniques recherchées, comme le maintien de l'intégrité, ou des caractéristiques de viabilité des cellules implantées. Par exemple, un gel à 1 $mg.mL^{-1}$ permet d'obtenir des structures cohérentes et reproductibles, à condition de maîtriser le pH ; un bouchage des buses d'impression survenant à pH

élevé. Le collagène pur n'est pas stable pour former une structure 3D, il doit donc être associé à d'autres polymères. D'ailleurs, sans l'application d'une réticulation supplémentaire, le collagène forme des hydrogels aux propriétés mécaniques médiocres. La réticulation peut être induite par voie chimique (formaldéhyde ou glutaraldéhyde) ou par voie enzymatique (transglutaminase) (Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). Différentes technologies ont été mises en œuvre pour permettre d'imprimer des solutions de collagène, *i.e.* jet d'encre, extrusion, impression assistée par laser (Inzana et al., 2014; Jakab, Norotte, Marga, Murphy, Vunjak-Novakovic & Forgacs, 2010 ; Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). Concernant l'extrusion, des imprimantes multi-têtes et/ou couplées à des méthodes de réticulation chimique (glutaraldéhyde) ou enzymatique (transglutaminase) existent (Hinton et al., 2015; Park et al., 2014 ; Smith, Christian, Warren & Williams, 2007 ; Smith et al., 2004). Toutefois, les principales difficultés, pour utiliser le collagène en tant qu'encre biologique par extrusion, sont le temps long de gélification et le gonflement (Murphy, Skardal & Atala, 2013; Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). Ce dernier point a d'ailleurs été mis en avant par (Munaz et al., 2016) pour qui, malgré leur facilité d'utilisation pour la construction de structures 3D, les modifications de la géométrie en raison de phénomènes de gonflement ou de dissolution constituent les principales limites à l'utilisation de ces molécules.

Les gels de gélatine ont une texture caractéristique qui permet une bonne sensation en bouche, associée à une bonne perception des saveurs. Comme indiqué précédemment, le pI a un rôle majeur sur la structure des protéines. Dans le cas de la gélatine, au pI, sa contraction est maximale et, donc sa viscosité minimale. Ce dernier paramètre augmentant lorsque le pH est modifié. Mais, si ce changement de pH est trop important, l'extension de la molécule tend alors vers son maximum et, un comportement non-Newtonien de la gélatine est observé ; la gélatine possédant un comportement Newtonien[5] en solution diluée. Le cisaillement ayant également une grande importance sur la viscosité, si celui-ci est trop important, il provoque une chute irréversible de la viscosité (Godoi et al., 2016).

0.5.2. Impact sur les lipides

Bien que des résultats traitant de produits à fort taux en matière grasse, comme le chocolat, soient disponibles dans la littérature, très peu d'études ont étudié l'effet de l'I3D sur les lipides, mais

[5] On appelle fluide Newtonien un fluide dont la loi contrainte/vitesse de déformation est linéaire. La constante de proportionnalité est appelée viscosité (Couarraze & Grossiord, 2000).

aussi réciproquement, l'effet des lipides sur l'imprimabilité de matrices. A notre connaissance, seuls les travaux de Le Tohic et al. (2018) et de Lille et al. (2018) traitent ce sujet dans le cas d'aliments. En effet, Le Tohic et al. (2018), dans le cas d'une matrice fromagère non-extrudée, ont montré que les globules gras étaient ronds et répartis de façon uniforme dans une phase protéique continue. Une structure comparable avait été observée sur du fromage fondu à 75 °C avec, néanmoins, des globules gras plus volumineux obtenus à cause d'un phénomène de coalescence au cours du chauffage. Après une étape d'impression par extrusion, réalisée à 4 $mL.min^{-1}$ et à 75 °C, la microstructure du fromage avait été fortement altérée ; la phase protéique était devenue discontinue et une modification morphologique (perte de l'aspect sphérique et augmentation de volume) des globules gras avait été observée, avec l'apparition de graisses interstitielles. Toutefois, il semblerait que les paramètres d'impression aient aussi un effet majeur, puisque, pour une impression à 12 $mL.min^{-1}$ et à 75 °C, la taille et la distribution des globules gras étaient plus homogènes. Ceci serait dû au taux du cisaillement plus important dans cette condition. Les interactions entre les protéines et les lipides semblent donc expliquer les modifications rhéologiques observées pour les fromages imprimés : texture plus douce et moins collante, à cause d'une quantité accrue de graisse superficielle libérée pendant le cisaillement.

Lille et al. (2018) se sont intéressés au rôle des lipides pendant l'impression, en travaillant sur de la poudre de lait, à la fois, comme sources de protéines et de matière grasse. Deux formulations présentant des taux de protéines équivalents, respectivement 21 et 22 %, ont été testées en solution dans de l'eau : une formulation écrémée (0,4 % MG) et une formulation demi-écrémée (9 % MG). Ces auteurs ont montré que, pour la formulation écrémée, la pâte était très visqueuse et difficile à imprimer, amenant à un dépôt irrégulier du matériau, à cause d'un caractère trop collant. En passant d'une concentration en poudre de lait de 50 à 60 %, l'impression était devenue impossible et ce, quel que soit le diamètre de la buse. En revanche, pour la formulation demi-écrémée, même concentrée à 60 %, l'imprimabilité s'était avérée excellente, tant au niveau de la précision que de la conservation de la forme imprimée. Lille et al. (2018) ont expliqué que la matière grasse agissait comme un lubrifiant dans le système d'extrusion et que le matériau était plus fluide. A noter que le taux de glucides était sensiblement différent entre les 2 formulations (32 et 23 %, respectivement), ce qui peut aussi avoir influencé l'écoulement du fluide. Enfin, Godoi et al. (2016) ont affirmé que l'utilisation des lipides en I3D pourrait être mise à profit. En effet, étant donné que la composition en triglycérides ainsi que leurs points de fusion différents influencent la texture de la viande, notamment la tendreté et la flaveur, les techniques d'I3D (en particulier, l'extrusion) ont le potentiel pour permettre de fabriquer des aliments

texturés à façon. En utilisant des acides gras à longueur de chaines différente, plus ou moins insaturés, il devrait être possible de fixer des points de fusion qui permettraient d'améliorer l'adhésion entre les différentes couches, conduisant ainsi à une meilleure conservation de la géométrie, lors des étapes de pré- et de post-traitement (Godoi et al., 2016).

0.5.3. Impact sur les glucides

Plusieurs travaux ont porté sur l'imprimabilité de différents polyholosides. Holland, Foster, MacNaughtan & Tuck (2018) ont montré qu'il était possible d'imprimer de la cellulose (en poudre), sous forme de couches, à condition de maîtriser les propriétés rhéologiques, la tension de surface et la densité du matériau. En utilisant la méthyl-cellulose comme matériau de référence pour simuler l'imprimabilité de différentes encres alimentaires, Kim et al. (2018) ont mis en évidence que des concentrations de 9, 11 et 13 % permettaient d'obtenir des structures cylindriques de 28 mm de diamètre pour des hauteurs de 20, 40 et 80 mm, qui ne s'effondraient pas. Les travaux de Vancauwenberghe et al. (2017), portant sur des formulations imprimables à base de pectine, ont consisté à tester, à paramètres d'impression constants, l'effet de différentes formulations à base de pectine, de chlorure de calcium ($CaCl_2$), de sérum albumine bovine (BSA) et de sirop de sucre. Afin d'assurer une structure tridimensionnelle cohérente et pérenne, l'ajout de $CaCl_2$ s'est avéré nécessaire pour réticuler partiellement la pectine. Cette étude a montré que les concentrations en pectine et en sirop de sucre influençaient directement la viscosité et, que la BSA stabilisait et favorisait l'aération du mélange. Par ces travaux, Vancauwenberghe et al. (2017) ont démontré la faisabilité d'imprimer des produits alimentaires texturés présentant des microstructures variables.

Parmi les polyholosides, l'amidon a lui aussi été beaucoup étudié. Liu, Zhang & Yang (2018) ont travaillé sur l'imprimabilité de purées de pomme de terre, plus ou moins supplémentées en amidon. Les résultats ont montré que, pour être imprimable, la purée devait contenir au moins 2 % d'amidon. Dans cette condition, une augmentation de la limite d'élasticité a été constatée, ainsi qu'une meilleure aptitude à l'extrusion. Par contre, à 4 % d'amidon, malgré une bonne conservation de la structure tridimensionnelle, l'aptitude à l'extrusion était médiocre, en raison d'une viscosité trop élevée (**Figure 0.4**). L'étude de Yang et al. (2018) a également permis de confirmer l'impression d'amidon en association avec du jus de citron (à 15 g/100 g d'amidon) et, de déterminer les paramètres optimaux d'impression : diamètre de la buse, vitesse de déplacement et taux d'extrusion, *i.e.* ceux conduisant à des structures présentant une surface lisse et sans déformation. Les travaux de Lille et al. (2018) ont

permis de mettre en évidence, à l'instar des lipides, que l'imprimabilité d'une solution à 15 % d'amidon était meilleure, lorsque la solution contenait de la poudre de lait demi-écrémée plutôt qu'une formulation écrémée. Cependant, l'écoulement au travers du système d'extrusion étant dépendant de la granulométrie des produits, l'aspect visqueux de l'amidon, associé à la présence de particules, entraîne rapidement des problèmes de colmatage de la buse lorsque des aliments d'origine végétale contenant des protéines, de l'amidon et des fibres, sont imprimés.

Au vu des études publiées sur le sujet, deux problèmes majeurs apparaissent concernant l'I3D alimentaire : 1) la granulométrie des produits utilisés (Lille et al., 2018) et, 2) les mécanismes de liaison entre les matériaux. Un contrôle des étapes du procédé en amont devrait suffire à répondre aux exigences du premier point ; concernant le second point, des auteurs comme Liu et al. (2017) préconisent d'utiliser des additifs, comme des graisses ou des protéines de plasma sanguin, de façon à améliorer la solidification au refroidissement ou la réticulation. En admettant que seuls des additifs considérés comme naturels peuvent être ajoutés, il est tout à fait imaginable d'utiliser des lipides riches en acides gras insaturés, ce qui permettra en même temps d'obtenir un bénéfice nutritionnel pour le consommateur.

Le principal problème concernant l'impression d'aliments reste donc l'obtention d'une texture adéquate, permettant une tenue en bouche agréable ou adaptée à la population cible. Les protéines, en tant que macromolécules structurales importantes, n'échappent pas à cet état de fait. Il faut donc élaborer des stratégies d'impression permettant d'obtenir des structures maîtrisées, sans utiliser d'additifs texturants (**Figure 0.7**). Comme déjà indiqué, une approche de ce type est présentée dans le **Chapitre 1** de ce mémoire.

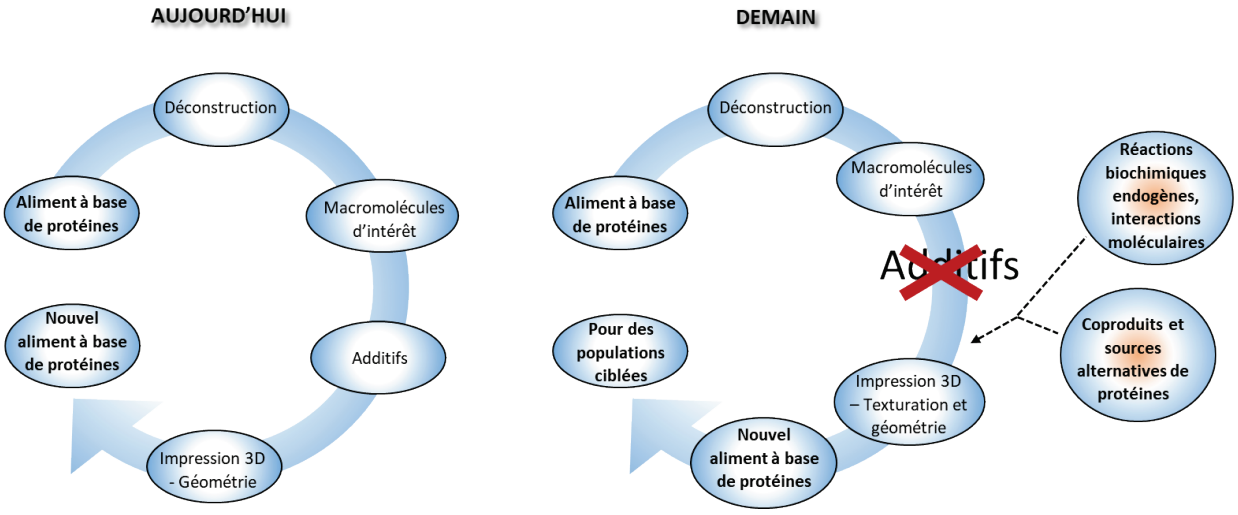


Figure 0.7. *Evolution envisagée, à court et moyen terme, de l'I3D alimentaire dans l'optique de concevoir de nouveaux aliments à base de protéines (d'après Portanguen et al., 2019).*

0.6. La problématique du post-traitement en impression 3D alimentaire

Le post-traitement, une étape essentielle du procédé d'I3D, regroupe l'ensemble des opérations unitaires pouvant être appliquées à l'aliment pendant ou juste après la phase d'impression, comme la cuisson, le séchage, la congélation, la lyophilisation… Dans cette section, nous traiterons des méthodes de cuisson qui peuvent être appliquées *in situ*, afin de stabiliser microbiologiquement l'aliment et le rendre consommable. Cette étape est de plus en plus étudiée dans la littérature, car de sa maîtrise va dépendre une grande partie des qualités finales de l'aliment imprimé (nutritionnelles, texturales et organoleptiques) (Blutinger et al., 2021; Dick et al., 2019a; Schillaci, Gràcia, Capellas & Rigola, 2022). Cette maîtrise est délicate, à l'instar de l'étude de Hertafeld et al. (2019), car une surcuisson peut rapidement survenir avec le risque d'altérer les qualités et générer des composés néoformés potentiellement délétères. Dans cette étude, la température de la source infrarouge, utilisée comme moyen de cuisson, pouvait atteindre 350 °C à une distance de 20 mm par rapport à l'aliment. En fonction de la taille et de la forme de celui-ci, obtenir une température à cœur comprise entre 60 et 75 °C nécessite donc de chauffer l'extérieur à une température d'au moins 180 °C, pendant 5 min minimum. L'étude en question ne fournissant pas de données de températures suffisamment précises, le barème indiqué ici est donné à titre indicatif, sur la base de mesures à cœur réalisées lors de la cuisson d'aliments de 80 g, identiques à ceux conçus par Schiell et al. (2023). Afin de préserver les qualités de l'aliment et surtout d'en assurer la sécurité sanitaire, l'OMS recommande d'atteindre une température de 72 °C à cœur d'un produit carné transformé, comme un steak haché. L'idée est donc de coupler un système de cuisson avec le système d'I3D. De cette façon, il serait possible de cuire l'aliment couche par couche. Pour ce faire, plusieurs méthodes de cuisson sont potentiellement applicables : le rayonnement laser, le rayonnement infrarouge, la convection à air chaud (avec humidités variables).

Le défi du post-traitement est de préserver les propriétés acquises lors de l'I3D, comme les dimensions, la structure et la texture, l'apparence et les propriétés nutritionnelles, tout en rendant le produit sûr d'un point de vue sanitaire (sécurité microbiologique et chimique). Aujourd'hui, il est difficile de combiner l'impression et le post-traitement dans le même appareil. Bien qu'il existe des imprimantes culinaires dotées de plateaux d'impression chauffants, il n'est possible de cuire que des aliments relativement plats, en raison de problèmes de conduction thermique, de gradient de température et de températures plus faibles que dans un four traditionnel. Des températures trop élevées (200-220 °C) pourraient endommager l'imprimante et libérer des substances nocives

provenant des composants en polymère de l'appareil. La cuisson à basse température (< 100 °C) présente aussi bien des avantages que des inconvénients. Les avantages comprennent la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques, tandis que les inconvénients comprennent un risque sanitaire accru dans le cas de températures inférieures à 70 °C, un risque de sous-cuisson ou d'hétérogénéités de température résultant d'un mauvais transfert de chaleur et, enfin, une durée de cuisson nécessairement plus longue. La durée de cuisson est une variable importante qui dépendra directement du mode de cuisson choisi, mais aussi de l'environnement proche de l'aliment. Elle sera donc à ajouter aux durées de préparation et d'impression. Pour les raisons évoquées précédemment, la cuisson des aliments imprimés est généralement effectuée au bain-marie de façon à optimiser les transferts de chaleur, mais ceci implique de procéder hors de l'imprimante. Cette approche a déjà été mise en pratique dans la littérature, notamment par Dick et al. (2019a) et Feng, Zhang, Bhandari & Ye, (2020), qui ont imprimé des aliments à base de viande maigre, de saindoux – ces deux ingrédients étant déposés indépendamment avec une géométrie prédéterminée – et de gomme de guar, de façon à obtenir un produit avec l'apparence d'un steak haché traditionnel, avant de les cuire sous-vide à 95–100 °C. Pour ce type d'aliments, la cuisson provoque un rétrécissement, qui résulte d'abord de la dénaturation des protéines, qui en se contractant, expulsent un mélange d'eau et de nutriments et, ensuite, d'une perte de matière grasse par fusion. Dans leur étude, Dick et al. (2019b) ont également observé des baisses de rendement de cuisson, en lien la teneur en matières grasses. Le comportement à la cuisson des aliments imprimés n'est donc pas très différent de celui des aliments traditionnels, bien que la façon dont la matière grasse a été déposée doit influencer grandement le niveau de pertes, car elle est moins liée à la partie maigre que dans un muscle classique. Ces pertes à la cuisson semblent donc dépendre de trois facteurs : la densité de remplissage, la teneur en matières grasses et les interactions mises en œuvre (Dick et al., 2019b). Différentes méthodes de post-traitement ont fait l'objet d'études, parmi lesquelles :

- ***La cuisson par rayonnement infrarouge***

Hertafeld et al. (2019) ont choisi de cuire les aliments post-impression, au moyen d'un chauffage infrarouge (IR). Les essais ont été réalisés avec un mélange alimentaire complexe de pâte de sésame (contenant de la farine de riz), de pâte de poulet (contenant du blanc d'œuf), de pâte de crevettes, de vin, de gingembre râpé et de poivre. Le mélange a été homogénéisé et la consistance a été ajustée visuellement en ajoutant de la farine de riz, jusqu'à obtention d'une encre alimentaire imprimable. Cette préparation a été traitée selon trois voies technologiques : l'I3D sans cuisson, l'I3D avec

chauffage IR *in situ* et, une fabrication manuelle suivie d'une cuisson au four. Les résultats ont montré que la cuisson n'entraînait aucune distorsion significative des dimensions de l'aliment imprimé et, que la cuisson couche par couche empêchait l'affaissement juste après l'extrusion. Le raidissement de la couche inférieure a également permis de maintenir une distance constante entre la buse et la couche nouvellement extrudée, ce qui a contribué à conserver la forme de l'aliment. Cette technologie a nécessité l'utilisation d'une équation pour relier la température et l'intensité du rayonnement IR par rapport à la distance à l'aliment. Cette étude a montré qu'il était possible de cuire un aliment imprimé en 3D *in situ*, mais cependant, il est dommageable qu'aucune analyse sensorielle ou aucune étude des propriétés mécaniques de l'aliment n'ait été réalisée après la cuisson pour évaluer l'acceptabilité des consommateurs

- ***La cuisson par radiofréquences***

La cuisson/stérilisation par radiofréquence a été utilisée dans le cas d'aliments destinés aux vols spatiaux (Jiang, Zhang, Bhandari & Cao, 2020). Les auteurs se sont rendu compte que l'utilisation des radiofréquences seules ne suffisait pas à assurer la qualité sanitaire de l'aliment constitué d'un mélange d'igname et de poulet. Un conservateur naturel (chitosane/ε-polylysine) a donc dû être ajouté. Cette étude montre que le traitement par radiofréquence n'a pas, non plus, eu d'impact positif sur la texture de l'aliment, puisque cette dernière a dû être ajustée par l'ajout de chitosane (2 $g.kg^{-1}$). Les barèmes de cuisson utilisés allaient de 90 °C/10 min à 110 °C/30 min (Jiang et al., 2020).

- ***La cuisson par micro-ondes***

L'utilisation de micro-ondes a également été étudiée, mais d'après Lv et al. (2023), des changements de forme spontanés sont observés, principalement causés par une déshydratation rapide des matériaux due à des différences de profondeur de pénétration des micro-ondes et à des propriétés diélectriques variables des matériaux. Un point positif a, cependant, été soulevé par Dick, Bhandari & Prakash (2021) : pour les produits carnés imprimés en 3D qui doivent être faciles à avaler, le chauffage par micro-ondes permet d'éviter la formation d'une croûte, conférant une texture molle à l'échantillon. A noter que l'impact de cette méthode de cuisson sur la qualité organoleptique de l'aliment n'a pas été évalué.

- ***La cuisson par rayonnement laser***

Une autre solution de cuisson embarquée est à l'étude depuis plusieurs années dans les imprimantes culinaires : la cuisson par rayonnement au laser. Cette technologie a été développée dans des organisations telles que l'Université de Columbia (USA) ou dans des entreprises privées telles que *Natural Machines* (Espagne), fabricant de l'imprimante culinaire 3D *Foodini®*. Cette méthode de cuisson offre au moins deux avantages : 1) une grande précision de cuisson, avec la possibilité de cuisson couche par couche, gagnant ainsi en homogénéité de température, et 2) une limitation de la température, car les surfaces extérieures n'ont plus besoin d'être surchauffées pour obtenir la température à cœur souhaitée. Le risque de générer des composés néoformés nocifs est ainsi réduit. A notre connaissance, cette technologie est encore en cours de développement.

Dans l'optique d'un post-traitement adapté à l'I3D, un faisceau laser présente plusieurs propriétés intéressantes, à savoir : un monochromatisme qui simplifie les calculs concernant l'absorption énergétique ; un rapport puissance/surface élevé ; et une très faible divergence qui permet une grande précision, mais qui peut entraîner une augmentation du temps de chauffage.

Pour déterminer la taille du faisceau laser au point de contact, il est nécessaire de s'intéresser à sa géométrie. En général, il s'agit d'ondes de type « gaussienne » qui se concentrent sur l'axe de sortie de la cavité optique du module laser. La **Figure 0.8** présente la répartition de l'éclairement dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation. Le rayon du faisceau, dans ce plan, correspond, par définition, à la distance entre l'axe optique et l'endroit où l'éclairement est divisé par $1/e^2$ par rapport au maximum d'éclairement de l'onde, nommé w. A la sortie du module, le faisceau converge jusqu'à un plan particulier (le col du faisceau) où il admet une taille minimale w_0, pour ensuite diverger. Plus la divergence du faisceau est grande, plus le rayon et la profondeur du faisceau dans le plan du col seront petits. Dans le cas des lasers, la divergence est très faible et le rayon à la distance focale est de l'ordre du millimètre.

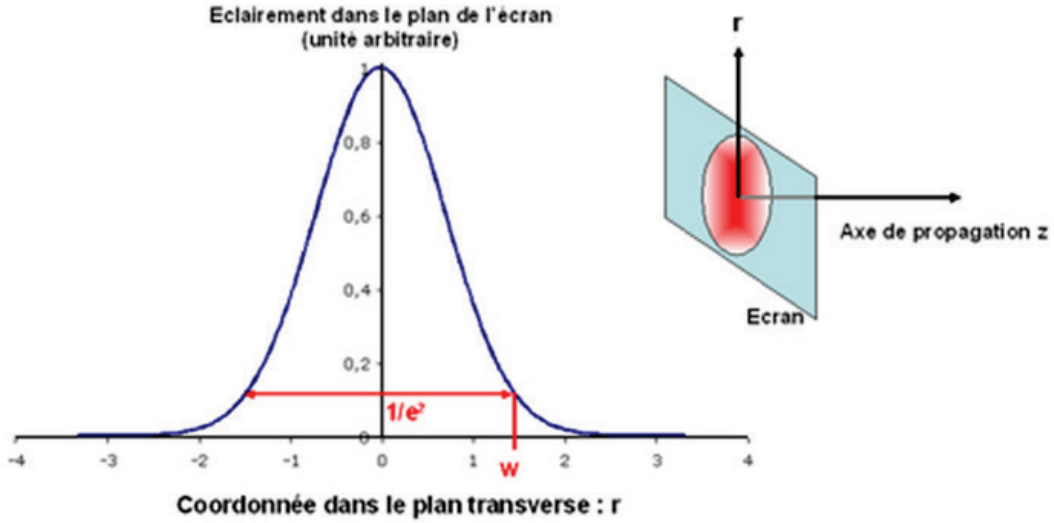


Figure 0.8. *Allure d'une onde gaussienne : répartition de l'éclairement d'un faisceau laser dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation (http://www.optique-ingenieur.org/fr/cours).*

La puissance délivrée par un laser pour des applications alimentaires doit être de l'ordre de 5 W (Blutinger et al., 2021). Cette puissance relativement faible permet de s'affranchir de l'ajout d'un système de refroidissement. Malgré un rendement η (Eq. 0.1) souvent médiocre (entre 0,1 et 60 %) Hée, Balty, Mayer, Courant & Lièvre (1998), la puissance fournie est suffisante pour cuire un échantillon :

$$\eta = \frac{P_{faisceau}}{P_{fourni}} \qquad \text{Eq. 01}$$

La longueur d'onde du rayonnement laser est généralement comprise entre 0,19 et 10,6 µm, dans une région du spectre électromagnétique comprenant les ultra-violets et l'infrarouge. Selon Blutinger et al. (2021), la longueur d'onde choisie impacte de façon différente l'aspect et, donc potentiellement les qualités de l'aliment (viande de poulet imprimée en 3D). Une longueur d'onde dans l'infrarouge (980 nm) provoque un brunissement plus marqué qu'un laser bleu dans le visible (445 nm). Il semblerait également que la cuisson laser permette de réduire de 50 % les pertes à la cuisson, comparativement à une cuisson en four.

La difficulté de ce type de cuisson est de maîtriser la profondeur de pénétration du faisceau au sein de la matrice, qui doit être égale à l'épaisseur des couches déposées pour garantir une cuisson homogène de la couche n et éviter une surcuisson de la couche n-1. Ceci dépend d'au moins trois facteurs : la distance matrice/laser, la focalisation du faisceau et la vitesse de déplacement. Les travaux

de Blutinger et al. (2021) ont montré la nécessité de développer des logiciels de contrôle et de pilotage pour cette étape de cuisson. Ces logiciels n'existent pas encore et le réglage des paramètres de cuisson restent, pour l'heure, empiriques. Cette approche a été utilisée pour développer, en parallèle de ce travail de thèse (résultats non présentés dans ce mémoire), un dispositif de cuisson par rayonnement laser (de type bleu) qui est désormais intégré à l'imprimante 3D conçue au laboratoire (*cf*. **Chapitre 1)**.

- ***La cuisson par convection***

L'utilisation d'un flux d'air chaud ou de vapeur pulsée peut sembler simple à première vue, mais contrôler par ce moyen, et avec succès, les transferts de chaleur sur un objet à géométrie variable, au cours de la fabrication, s'avère complexe. Cela nécessite de canaliser le flux à travers des buses positionnées avec précision. Celles-ci doivent être mobiles pour s'adapter au mieux à la géométrie de l'objet. Ce type de dispositif nécessite donc un système de déplacement de tête d'impression contrôlé. Une telle approche a été mise en œuvre au cours de ce travail de thèse pour en évaluer la faisabilité (*cf*. **Chapitre 1**).

Chacune des technologies de post-traitement présentées ici a ses propres avantages et inconvénients (**Tableau 0.3**). Cependant, dans une optique d'application à plus grande échelle, à l'extérieur du laboratoire, on se doit de tenir compte, à la fois, des coûts économiques et des impacts environnementaux. Le procédé doit être rentable, si possible durable et, utiliser une quantité d'énergie (en $kWh.kg^{-1}$ d'aliments) pour cuire les aliments imprimés qui ne soit pas supérieure à celle d'une cuisson traditionnelle, comme une cuisson en four ou au bain-marie par exemple.

Tableau 0.3*. Avantages et inconvénients des principales méthodes de cuisson utilisables en I3D alimentaire.*

Type de transferts	Source d'énergie	Avantages	Contraintes pour l'I3D	Références
Radiatif	Laser Infrarouge Ultra-violet	Précision et facilité de mise en œuvre	Profondeur de pénétration, surcuisson possible en surface	Fukuchi et al. (2012) Aboud et al. (2019) Han et al. (2019)
	Radiofréquences Micro-ondes	Augmentation de la cohésion des gels	Complexe, effet bactéricide, peu adapté pour la cuisson	Wang et al. (2011)
Convectif	Four/jet d'air ou vapeur	Conserve l'humidité	Manque de précision, surcuisson en four	Bhatt et al. (2020)

0.7. Impression 3D alimentaire et durabilité

Il est désormais indispensable d'ajouter la dimension de durabilité lors de la conception d'aliments innovants ou fonctionnels.

Chaque année, 30 % des denrées alimentaires produites dans le monde sont gaspillées (FAO, 2023), soit en amont des filières dans les pays en voie de développement, soit au sein des circuits de distribution dans les pays occidentaux. L'impact environnemental et sociétal de ce gaspillage à grande échelle, est donc majeur. Afin de contribuer à le limiter, il s'avère que des sources de protéines animales, mais aussi végétales, pourraient être mieux valorisées. Et là, où, Farouk, Yoo, Hamid, Staincliffe, Davies & Knowles (2018) utilisent du *Longissimus dorsi* (faux-filet de bœuf) pour augmenter le taux de protéines dans l'alimentation, il serait tout-à-fait envisageable d'utiliser, en I3D alimentaire, des morceaux moins nobles, mais de qualité nutritionnelle satisfaisante, comme des abats ou certains coproduits animaux.

L'évaluation de la durabilité des systèmes d'I3D alimentaire n'existe pas à l'heure actuelle, ceci est dû à l'apparition très récente de cette technologie et au fait qu'elle est toujours en développement. Cependant, plusieurs études ont tenté d'évaluer la durabilité de l'I3D en tant que procédé alternatif, dans les domaines industriels où elle est particulièrement bien développée (Colorado, Velásquez & Monteiro, 2020). Il est donc possible de tirer quelques résultats concrets de ces travaux et de les transposer au cas de l'I3D alimentaire.

Plusieurs études se sont concentrées sur les impacts environnementaux de l'I3D, en évaluant la consommation en énergie (électricité) ou en estimant les économies potentielles de matières premières ou relatives à la gestion des déchets (Khosravani & Reinicke, 2020; Peng, 2016). Selon Kellens, Mertens, Paraskevas, Dewulf & Duflou (2017), l'énergie requise par unité de fabrication peut être jusqu'à deux fois plus élevée pour l'I3D que pour l'usinage conventionnel ou le moulage par injection. Selon Le Bourhis, Kerbrat, Dembinski, Hascoet & Mognol (2014), la stratégie adoptée pour la fabrication par I3D est prépondérante et peut conduire à un impact plus important de la consommation de matières premières par rapport à la consommation d'électricité. Cette consommation de matériaux doit encore être évaluée, notamment par le biais de modèles analytiques. Selon Peng (2016), cinq actions, parfaitement applicables à l'I3D, peuvent contribuer à réduire l'impact des émissions de carbone : 1) réduire le besoin de matières premières ; 2) réduire l'utilisation de processus industriels qui consomment beaucoup d'énergie et de matières premières ; 3) optimiser les performances des processus pour concevoir des produits de manière efficace et

flexible ; 4) réduire la masse des composants, de façon à réduire l'empreinte carbone des moyens de transport, et 5) limiter l'impact de la logistique, en veillant à ce que la fabrication soit effectuée au plus près des zones de consommation. Ce dernier point est confirmé par le fait que l'I3D permet de réduire les stocks, tout en permettant le recyclage et la réutilisation des matériaux imprimés (Kietzmann, Pitt & Berthon, 2015). Outre la technique elle-même, la façon dont elle est utilisée (c'est-à-dire le profil de l'utilisateur) a également une certaine influence sur les impacts environnementaux des produits imprimés et doit être prise en compte dans les analyses de cycle de vie (ACV) qui sont effectuées (Barros & Zwolinski, 2016). Il reste encore beaucoup à faire pour dissiper certaines des approximations existantes, en particulier dans les ACVs ou dans les impacts que l'I3D peut avoir sur la santé humaine et la pollution atmosphérique (Khosravani & Reinicke, 2020; Rejeski, Zhao & Huang, 2018). Dans le cas de l'I3D alimentaire, il est difficile de prendre en compte la perspective de réduction de la quantité de matières premières, mais trois points peuvent néanmoins apporter une dimension durable à cette technologie : 1) la valorisation d'aliments actuellement gaspillés (coproduits, végétaux hors standards…) ; 2) la fabrication au plus près des populations cibles, et 3) la capacité de stabiliser l'aliment imprimé par des méthodes de cuisson et/ou de conditionnement, qui permettraient une conservation à « haute température » (10 °C, par exemple), voire à température ambiante.

La prise en compte des impacts sociétaux et économiques de l'I3D en est encore à ses balbutiements. En ce qui concerne l'impact sociétal, Huang, Liu, Mokasdar & Hou (2013) ont indiqué que, d'un point de vue technique, l'I3D pourrait avoir une incidence positive sur la société, grâce à la production de produits de santé personnalisés qui pourraient apporter une plus-value en termes de qualité de vie et, qu'une amélioration des chaînes d'approvisionnement permettrait d'augmenter l'efficacité et la réactivité des entreprises pour répondre à la demande. D'autre part, ces mêmes auteurs ont indiqué que l'I3D pourrait potentiellement avoir un rôle négatif sur la société si la consommation d'énergie tout au long du cycle de vie du produit et, la santé au travail des professionnels utilisant la fabrication additive étaient mal contrôlées. Plus récemment, à travers un exemple relatif à la production de téléphones mobiles, Beltagui, Kunz & Gold (2020) ont montré que l'I3D pouvait exercer une influence sociétale positive, à la condition qu'il y ait une concomitance entre la disponibilité des imprimantes 3D, les attitudes des consommateurs à l'égard de la durabilité sociale et l'entrée sur le marché de nouveaux produits. Dans ce contexte, l'I3D peut offrir une solution, en tirant parti de l'effort volontaire des individus grâce à la conception ouverte et, aider à surmonter les contraintes liées aux ressources, soutenant ainsi la diffusion de l'innovation dans une chaîne d'approvisionnement socialement durable.

Pour comprendre l'effet économique de l'I3D, il convient de garder à l'esprit que le principal avantage de cette technique réside dans la personnalisation, permettant de transformer directement un modèle numérique 3D en un produit physique, alors que la personnalisation avec des méthodes de production conventionnelles est très coûteuse, notamment en raison de l'automatisation des processus requis par la production en série. Même si le coût énergétique de l'I3D reste élevé par rapport à la fabrication traditionnelle, sa flexibilité d'utilisation pour les petites séries et les marchés de niche en fait une méthode de choix (Thakur & Modi, 2020). Selon Weller, Kleer & Piller (2015), la technologie d'I3D permet de fabriquer des produits personnalisés avec des coûts de fabrication réduits, car elle ne nécessite aucun outil ou moule, ceci est parfaitement applicable à l'I3D alimentaire. Elle permet également la production d'objets fonctionnels complexes en une seule étape, ce qui réduit potentiellement le besoin de travail d'assemblage. La fabrication additive offre un haut degré de flexibilité qui permet la conception de produits hautement personnalisés et permet aux entreprises de pénétrer de nouveaux marchés ou de desservir plusieurs marchés en parallèle. Une autre opportunité intéressante, découlant de l'I3D, est la capacité des consommateurs à devenir leurs propres producteurs, peut-être même en concurrence directe avec les fabricants établis (Weller et al., 2015). Dans tous les cas, l'impact économique de l'introduction de la technologie d'I3D dans la société devrait être pris en compte à l'avenir.

0.8. Les principales perspectives en matière d'impression 3D alimentaire

La production par I3D d'aliments, dans un but de personnalisation de l'alimentation, paraît tout-à-fait pertinente et crédible. Cette technologie a été conçue à l'origine pour du prototypage, de la conception sur mesure ou de la petite série. À ce jour, les imprimantes 3D alimentaires ne parviennent pas à suivre les cadences industrielles de production, en partie parce que les temps d'impression sont encore trop longs. Même si dans certains secteurs d'activité (construction mécanique), la production de masse est désormais envisagée grâce aux avancées technologiques, le secteur alimentaire est loin d'en être à ce stade de développement. De plus, il n'est pas certain que les consommateurs soient prêts à consommer des aliments imprimés au quotidien (*cf*. **Chapitre 4**). D'autre part, la personnalisation des aliments par l'I3D, concept formulé par Wegrzyn et al. (2012), est le moyen le plus probable pour que cette technologie puisse bénéficier au plus grand nombre. À notre avis, ce concept comporte trois aspects distincts, mais complémentaires : (i) la nutrition préventive, (ii) la nutrition curative et (iii) la nutrition adaptative (Portanguen et al., 2022).

La nutrition préventive est ici l'aspect le plus important, car plusieurs catégories de personnes peuvent être concernées. Bien que la plupart des habitants des pays industrialisés aient accès à une alimentation équilibrée, certaines catégories de personnes peuvent développer des carences soit par choix (préférences alimentaires), soit par manque de ressources, soit en raison de problèmes médicaux (difficultés à se nourrir, allergies ou intolérances). Les enfants sont directement concernés parce qu'ils sont souvent réticents à suivre les recommandations nutritionnelles, en particulier celles concernant la consommation régulière de fruits et légumes. C'est tout l'objet des travaux de Derossi, Caporizzi, Azzollini & Severini (2018), qui ont développé une formulation imprimable à base de fruits destinée aux enfants âgés de 3 à 10 ans, appétissante, de façon à leur fournir 5 à 10 % de leur apport quotidien en énergie, calcium, fer et vitamine D. Les femmes enceintes (Dankar, Haddarah, El Omar, Sepulcre & Pujolà, 2018) sont également une cible privilégiée, en raison d'un régime alimentaire fortement modifié pendant la grossesse, avec plusieurs aliments non recommandés, voire proscrits. Afin de limiter l'apparition de carences, un suivi de la grossesse est nécessaire, avec, le plus souvent, une prise de compléments alimentaires. Ces compléments, contenant un ensemble de nutriments adaptés au consommateur, commencent désormais à être imprimés en 3D. C'est le cas notamment de la société « *Get Nourished* » qui propose, *via* un questionnaire et un algorithme, de fabriquer un aliment, sous forme de gomme à mâcher, qui soit personnalisé en termes de formulation. Actuellement, sept ingrédients sont disponibles (vitamines, minéraux, *etc.*) et intégrés dans un aliment végétalien de type gel hydrocolloïde, de façon à assurer une biodisponibilité optimale. Selon Augusto (2020), des procédés innovants tels que l'I3D pourraient également améliorer le bien-être des personnes atteintes de reflux gastro-œsophagien, une maladie répandue, notamment en améliorant la rhéologie des aliments. Dans le contexte de la nutrition préventive, nous devons également parler des personnes qui pratiquent une activité physique intense. Dans ce cas, l'I3D peut aider, grâce à une formulation alimentaire intelligente, à assurer l'apport en protéines et en calories approprié pour les sportifs de haut niveau, par exemple.

Parmi les populations les plus enclines à bénéficier d'une forme de nutrition préventive et curative, nous pouvons citer les personnes âgées ; les travaux effectués dans le **Chapitre 3** leurs seront, d'ailleurs, largement consacrés. Les personnes âgées atteintes de troubles de la mastication consomment des aliments moins difficiles à mâcher, mais aussi souvent plus pauvres sur le plan nutritionnel, alors qu'elles ont un besoin accru de protéines de très haute qualité (Buffière et al., 2017). C'est généralement le cas pour la viande, qui est souvent éliminée de l'alimentation, car elle est considérée comme difficile à mastiquer, entraînant une carence en protéine qui, au fil des ans, peut

avoir de graves conséquences : dénutrition, sarcopénie, puis perte de mobilité et d'autonomie. Les travaux de Farouk et al. (2018) montrent que les protéines animales peuvent être utilisées sous une forme différente, afin d'augmenter l'absorption des protéines pour les personnes ayant des difficultés de mastication. L'incorporation de viande rouge lyophilisée dans divers aliments (pain, spaghettis, yogourt, crème glacée et chocolat) a permis d'augmenter les niveaux de protéines jusqu'à 28 %, tout en assurant une bonne acceptabilité de ces produits par les consommateurs. Cette étude illustre parfaitement les innovations qui peuvent être développées en appliquant de nouveaux procédés tels que l'I3D, qui permet d'adapter à la fois la forme et la texture des aliments. Il est également possible d'allier fonctionnalité et sensorialité, car, là où les substituts alimentaires traditionnels (bouillie, gels riches en protéines, *etc.*) (*cf*. **Chapitre 3**) sont souvent rejetés par les consommateurs, l'aspect « *food design* » peut éveiller l'intérêt d'une personne à manger, en créant une sensation d'appétence par l'apparence (forme, couleur, *etc.*).

L'approche de "nutrition adaptative" est très probablement la plus innovante des trois approches citées dans cette partie (Portanguen et al., 2022). L'un des avantages de l'I3D, quel que soit le domaine d'application, est sa capacité à concevoir et à fabriquer localement (Lupton, 2017; Lupton & Turner, 2016). Ceci est particulièrement intéressant pour les personnes travaillant dans des environnements hostiles, isolés ou confinés. De nombreux projets ont été développés, notamment à destination des militaires déployés dans les zones de guerre. L'*US Army* et l'*US Navy* se sont déjà engagées dans un programme visant à créer des aliments parfaitement adaptés aux besoins des soldats, disponibles à la demande, et limitant les coûts logistiques et les déchets lors du conditionnement. Il sera possible de pousser le concept encore plus loin, en utilisant les ressources disponibles localement pour compléter les rations. Il s'agit ici d'un exemple qui commence à être décliné à d'autres applications, comme la nutrition des astronautes.

Selon Zhao et al. (2020), le motif de remplissage, ainsi que le rapport surface/volume, sont d'une grande importance, non seulement pour la texture et la géométrie d'un aliment imprimé, mais aussi pour le devenir des composés actifs qui peuvent avoir été ajoutés pendant la préparation. C'est le cas des probiotiques, qui ont un bien meilleur taux de survie après la cuisson, dans le cas d'un remplissage en nid d'abeille et d'un rapport surface/volume élevé. Outre les probiotiques, d'autres composés contenant des ingrédients actifs font également l'objet de recherches pour étudier leur libération dans le tube digestif après encapsulation avec de nouveaux bioplastiques comestibles. Il est donc possible de recycler certains sous-produits végétaux pour en exploiter leurs propriétés physiques et mécaniques dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. C'est le cas de la zéine, une protéine

dérivée de résidus de maïs, qui peut être récupérée sous forme de bioplastique, puis extrudée pour fabriquer des objets comestibles imprimés en 3D. Malgré sa faible valeur nutritionnelle (bien que riche en leucine), cette protéine est reconnue comme sûre pour la consommation humaine par la *Food and Drug Administration* (FDA - USA). Lorsque la zéine est combinée à un plastifiant de type glycérol, ses propriétés deviennent intéressantes dans le secteur alimentaire, car le matériau imprimé contenant cette zéine peut alors agir comme une barrière à l'eau dans les aliments complexes multicouches et multi-ingrédients (Chaunier, Della Valle, Dalgalarrondo, Lourdin, Marion & Leroy, 2017). Il peut également conduire à des solutions utiles pour la texturation des aliments destinés aux personnes souffrant de carences masticatoires, en permettant de coupler une faible résistance à la rupture avec un taux de fragmentation élevé. Ces propriétés permettent de maintenir une résistance mécanique pour le consommateur afin que la sensation en bouche reste acceptable (Chaunier, Guessasma, Belhabib, Della Valle, Lourdin & Leroy, 2018).

SYNTHESE DU CHAPITRE 0

Il apparaît que, mise à part l'extrusion, peu de méthodes d'impression 3D conventionnelles peuvent convenir pour l'impression d'aliments. L'impression 3D de viande et produits carnés reste problématique, notamment au niveau de la texture du produit fini. Pour lever ce verrou, la formulation reste le levier privilégié mais, d'autres moyens peuvent être mis en œuvre. Etant donné que les imprimantes 3D alimentaires actuelles sont mal adaptées à l'impression des produits carnés, les efforts doivent porter sur une adaptation des machines aux contraintes des matrices alimentaires, et non l'inverse (**Figure 0.9**). Ceci permettra de limiter le recours à des additifs texturants. Il s'agit de l'objectif du **Chapitre 1** de ce mémoire. Le post-traitement et la conservation des aliments carnés imprimés restent à être mieux définis et constituent des points de vigilance qui seront abordés à la suite de ce travail de thèse.

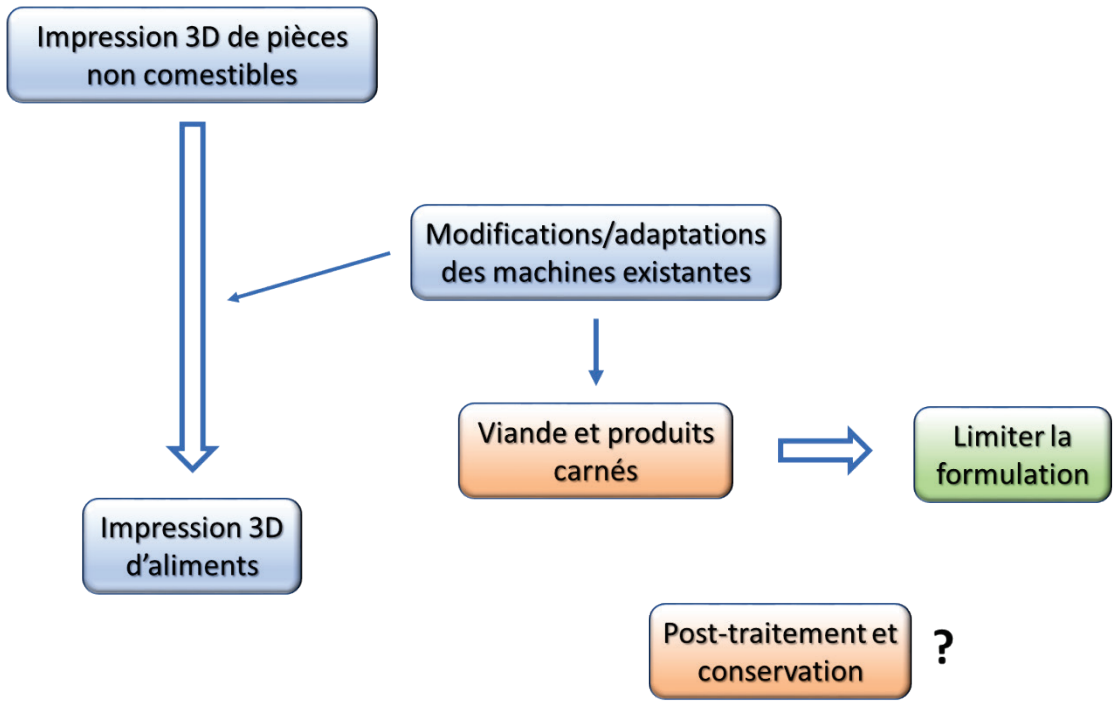


Figure 0.9. *Problématique de l'impression 3D d'aliments.*

Chapitre 1 :

Développement d'une imprimante 3D alimentaire et optimisation du procédé d'impression pour la fabrication d'aliments fonctionnels carnés

1.1. Problématique

Afin de répondre à la problématique scientifique suivante : comment fabriquer un aliment fonctionnel à base de protéines d'origine carnée présentant une texture maîtrisée, il a été décidé de développer un système d'impression 3D alimentaire, à partir d'une machine à dépôt de fil fondu du commerce. Ce développement constitue une preuve de faisabilité pour la conception de produits carnés par I3D.

Ce chapitre est, en grande partie, basé sur le travail publié dans l'article « Portanguen, S., Tournayre, P., Gibert, P., Léonardi, S., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2022). Development of a 3D printer for the manufacture of functional food protein gels. *Foods,* 11, 458. DOI: 10.3390/foods11030458 », qui décrit concrètement le développement d'une solution d'I3D destinée aux produits carnés (*cf*. **Annexe V 5**) (**Figure 1.1**). Pour illustrer ce développement et son applicabilité à l'impression d'aliments carnés, un milieu modèle à base de gélatine a été utilisé.

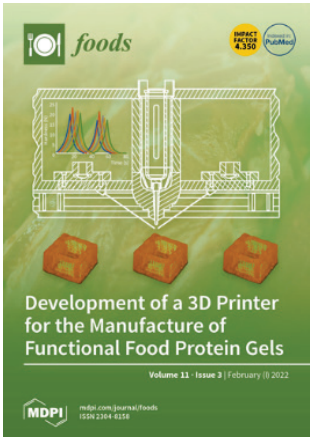


Figure 1.1. *Couverture de la revue internationale Foods, dont l'illustration correspond à un schéma inspiré par l'article Portanguen et al. (2022), publié dans ce numéro.*

Selon la définition de Roberfroid (2000), la conception d'un aliment fonctionnel doit respecter certains critères, notamment de naturalité (*cf*. **Chapitre 3**). La formulation ne pouvant pas, à elle seule, répondre à l'ensemble du cahier des charges, sauf en la complexifiant avec le risque d'ajouter des éléments de synthèse, cette conception doit donc aussi intégrer le procédé de fabrication de façon à l'adapter à l'aliment, et non l'inverse. Dans le cadre de ce travail, l'I3D a été considérée comme un procédé alimentaire de rupture, adaptable et capable d'intégrer différentes sous-opérations unitaires (extrusion, chauffage, refroidissement) de façon coordonnée. Comme présenté dans le **Chapitre 0**,

l'extrusion reste la méthode privilégiée pour imprimer des aliments. C'est donc cette méthode qui a été utilisée dans ce travail. Elle présente l'avantage d'être relativement facile à mettre en œuvre - même si elle est dépendante de la matrice utilisée - et de convenir à une large gamme d'aliments.

1.2. Matériels et méthodes

Le développement d'un prototype d'imprimante 3D alimentaire a nécessité l'utilisation de différents matériels et outils pour la conception, la validation et la mise en œuvre.

1.2.1. Les gels protéiques

A l'instar du **Chapitre 2**, un gel de gélatine a été choisi comme milieu modèle pour mettre au point les prototypes d'imprimante 3D. En effet, l'aspect du gel, homogène et translucide, a facilité l'observation des défauts de géométrie, ainsi que la mesure de l'épaisseur des couches déposées, comme nous le verrons dans la section 1.3.3.1.4. Ce milieu modèle était composé de gélatine de type A d'indice Bloom égal à 200, produite à partir de peau de porc (Caldic, France). Il a été utilisé avec les deux prototypes d'imprimante 3D décrits dans ce chapitre. Toutefois, pour le premier prototype d'imprimante, l'absence de régulation de température au niveau du plateau d'impression nous a contraint à utiliser une formulation déjà éprouvée, issue de la littérature (Giuseppe et al., 2018) et composée de 1,6 g de gélatine, 1,4 g d'alginate (Sigma Aldrich, France) et de 20 mL de solution saline à base de tampon phosphate (Sigma Aldrich, France). Même dans le cas d'un gel de gélatine, cette formulation présentait l'inconvénient de contenir un additif texturant, comme cela est très souvent mentionné dans la littérature traitant d'impression 3D de matrices alimentaires (*cf*. **Chapitre 0**).

1.2.2. La conception assistée par ordinateur

La méthode des éléments finis, qui est le noyau de calcul de l'Ingénierie Assistée par Ordinateur (IAO), a vu le jour dans les années 1950-1960, mais la Conception Assistée par Ordinateur (CAO) utilisée pour fournir des modèles géométriques est apparue dix ans plus tard (Wang & Zhang, 2023). La CAO regroupe l'ensemble des logiciels et techniques permettant une modélisation géométrique pour virtuellement concevoir et évaluer un objet, par exemple, dans le cas de l'I3D, celui qui va être imprimé. Aujourd'hui, de nombreux logiciels commerciaux de CAO existent. Pour la présente étude, le logiciel *Inventor* 3D® (Autodesk®, San Francisco, CA, USA) a été utilisé pour modéliser l'ensemble des

pièces nécessaires au développement des prototypes présentés dans ce travail, ainsi que pour mettre en œuvre les premières approches de design génératif (*cf*. **Chapitre 3**). Les formats de fichier en sortie du logiciel sont nombreux, le plus communément utilisé est le format stl (Standard Triangle Language) (*cf*. 1.2.5.1).

La modélisation géométrique peut aussi se faire par acquisition d'images via un scanner, notamment quand les cotes de l'objet sont difficiles à mesurer. Au sein de notre laboratoire, le scanner *EinScan Pro+* (Shining 3D, Hangzhou, Chine) permet, après calibration, de numériser un objet avec une résolution de 50 µm. L'association avec un plateau tournant motorisé et l'utilisation du logiciel *Einscan Pro V3* (Shining 3D, Hangzhou, China) permettent de générer des fichiers au format stl, qui peuvent être ensuite converti en G-Code pour être lus par une imprimante 3D (*cf*. 1.2.5.1). Des logiciels tels que Meshmixer (Autodesk®, San Francisco, CA, USA) ou *Blender* (Blender Foundation, Amsterdam, Pays-Bas) permettent de modifier le fichier de numérisation. Les logiciels dédiés à la conception des dispositifs ont été installés sur un ordinateur dédié (DELL Precision 3630, Intel Core i9-9900K, 64GB RAM, SSD 1 TB, carte graphique NVIDIA Quadro RTX4000).

1.2.3. Les logiciels et outils de développement utilisés

- ***Arduino***

Pour le développement de programmes destinés aux cartes électroniques, l'environnement de travail d'Arduino® (Arduino IDE) a été utilisé. Cet environnement permet d'écrire et de compiler le programme, puis de le téléverser directement dans la carte électronique. Un moniteur permet d'échanger des informations avec la carte électronique via une liaison série.

- ***Adobe Xd***

Adobe Xd (Adobe Inc) a été utilisé pour la conception et la réalisation de la nouvelle interface (écran tactile). Il s'agit d'un outil de conception vectoriel utilisé pour les applications *web* et mobiles. Il permet la création de prototypes et une visualisation directe du résultat.

- ***Design Spark PCB***

Design Spark PCB a été utilisé pour concevoir le nouveau circuit imprimé. Il s'agit d'un logiciel

proposé gratuitement par *RS Components* (Londres, Royaume-Uni) qui permet de réaliser les schémas de câblage d'un circuit électronique, puis d'en effectuer le routage, afin d'obtenir un typon[6] de tirage pour la gravure du circuit imprimé. Le logiciel a été pensé pour que l'utilisateur puisse utiliser facilement les composants proposés sur le site de *RS Components*, mais permet aussi de réaliser ses propres composants et de lier un composant schématique à son empreinte.

- ***Repetier Host***

Le contrôle de l'imprimante 3D alimentaire se fait à l'aide du logiciel Repetier Host. Ce logiciel intègre plusieurs « *slicers* » (ou « trancheurs »), dont Ultimaker Cura, qui sont des programmes permettant de découper les modèles 3D en couches, et de préparer les commandes qui seront envoyées à l'imprimante 3D. Le logiciel permet, non seulement de préparer les impressions, mais peut aussi être directement connecté à l'imprimante par un port USB, afin d'avoir un contrôle de son état (températures, mouvements, *etc*.). Il est aussi possible de contrôler directement l'imprimante de manière manuelle en déplaçant le plateau et la tête d'impression selon plusieurs axes, de modifier en direct la température cible des différents organes, ou de modifier les paramètres de l'imprimante, en lui envoyant des ordres en G-Code.

- ***Ultimaker Cura***

Ultimaker Cura fonctionne en découpant le fichier modèle de l'utilisateur en couches et en générant un G-code spécifique à l'imprimante. Une fois terminé, le G-Code peut être envoyé à l'imprimante pour la fabrication de l'objet physique. Ce logiciel *open source*, compatible avec la plupart des imprimantes 3D de bureau, peut fonctionner avec des fichiers dans les formats 3D les plus courants, tels que « stl ».

- ***Marlin***

Le micrologiciel Marlin est un logiciel communautaire fonctionnant sur la carte principale de l'imprimante 3D et gérant toutes les activités en temps réel de la machine. Il coordonne les températures, les capteurs, l'écran LCD, les boutons et tout ce qui est impliqué dans le processus d'I3D. Le langage de commande de « Marlin » est un dérivé du G-Code. Lorsque « Marlin » reçoit des

[6] Le typon est un masque, composé d'une feuille transparente, sur laquelle est imprimé un motif dans une encre opaque.

commandes de mouvement, il les ajoute à la file d'attente de mouvements à exécuter, dans l'ordre reçu.

- ***Simplify3D®***

Il s'agit d'un logiciel de tranchage généraliste, payant, permettant un réglage fin des paramètres d'I3D. Dans le cadre de ce travail, il a été essentiellement utilisé lors des phases de prototypage, afin de générer les G-Codes pour l'imprimante Volumic Stream 30 Pro (matériaux polymères).

- ***Fabricate®***

Fabricate® est un environnement de travail, en ligne ou autonome, propriétaire de la société DeskTop Metal™. Il permet la gestion des flux de travail, depuis les fichiers numériques jusqu'aux pièces frittées lors des impressions 3D métal. Son rôle est d'optimiser les différentes étapes du procédé, notamment l'impression pour limiter le gaspillage de matériaux.

1.2.4. Les méthodes analytiques

Toutes les méthodes analytiques utilisées dans ce chapitre ont été répertoriées dans le **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1. *Liste des matériels et équipements utilisés pour cette étude.*

Matériels	Fournisseurs	Pays
Balance de précision AB204-S	Mettler-Toledo	USA
Thermo-anémomètre (1-30 $m.s^{-1}$)	Metrica	Italie
Caméra infrarouge FLIR One Pro	FLIR	France
Stéréomicroscope MZ6	Leica Biosystems	Allemagne
Caméra associée DS-Fi3	Nikon	Japon
Logiciel caméra NIS-Elements	Nikon	Japon
Texturomètre EZ-LX	Shimadzu	France

1.2.5. Les imprimantes 3D

Les imprimantes 3D utilisées au cours de cette thèse font partie du laboratoire de conception numérique d'aliments de l'unité QuaPA et ont été, en partie, financées par le Contrat de Plan Etat Région (projet CPER 3DBio).

1.2.5.1. Imprimantes 3D polymères

Les modifications mécaniques apportées aux prototypes d'imprimantes 3D alimentaires présentés dans ce chapitre ont été réalisées, soit par usinage conventionnel (fabrication soustractive), soit le plus souvent par fabrication additive. Un certain nombre d'éléments périphériques intégrés aux imprimantes alimentaires, ou nécessaires aux modes opératoires, lors des phases expérimentales, ont également été conçus et fabriqués par I3D. Pour cela, deux imprimantes 3D polymères ont été utilisées (**Figure 1.2**) :

- La *Volumic Stream* 30 Pro (Volumic, Nice, France) : imprimante mono-tête, multi-matériaux, dotée d'une résolution en x et y de 60 µm et, en z de 6 µm ;
- La *Makerbot Method X* (Makerbot Industry, Brooklin, NY, USA) : imprimante double-tête, multi-matériaux (dont des filaments de supports solubles), dotée d'une précision dimensionnelle de 200 µm et d'une résolution de 20 µm (de 20 à 400 µm pour l'axe z).

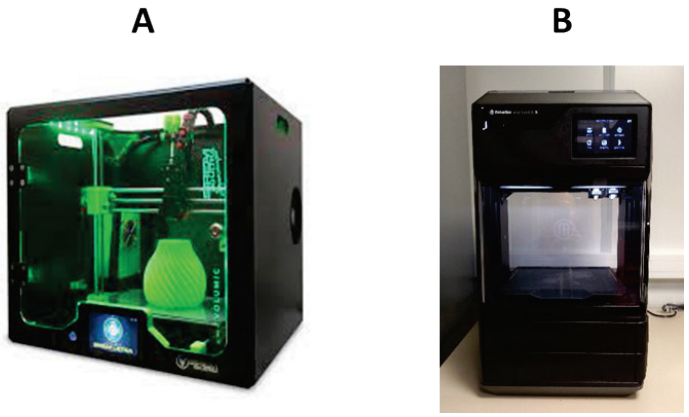


Figure 1.2. *Différentes imprimantes polymères du laboratoire utilisées dans ce travail : A – Volumic Stream 30 Pro et, B – Makerbot Method X.*

L'ensemble des pièces conçues et fabriquées au cours de ce travail l'ont été, en utilisant une résolution de 100 µm et une buse d'impression de 0,4 mm de diamètre. Le format numérique « stl » permet de stocker les informations d'un modèle 3D, uniquement en termes de géométrie. Le format représente les surfaces brutes du modèle avec de petits triangles ou des mailles. Plus la structure est détaillée, plus il y aura de mailles affichées pour représenter le modèle. Le fichier « stl » doit être interprété par un logiciel de tranchage, afin de générer les G-Codes destinés à piloter l'imprimante ou tout autre machine à commande numérique. Le logiciel de tranchage utilisé ici est Simplify3D® 4.1 (Cincinnati, OH, USA). Le G-Code, qui est un langage de programmation de pilotage de machines-outils à commande numérique, est constitué de lignes de commandes qui sont lues les unes après les autres.

Chaque ligne débute par la lettre G suivie d'un code donnant la nature de l'instruction, elle-même suivie de paramètres qui lui sont liés. Par exemple, 'G1 X50' indique une instruction de type 1, soit le déplacement d'un ou plusieurs axes, dont le paramètre est 'X50', ce qui signifie le déplacement de la tête d'impression selon l'axe x, de 50 mm dans le sens positif. Le G-Code est complété par du M-code qui fonctionne de la même façon et, qui sert à contrôler la machine et ses spécificités. Ce M-code est spécifique à chaque type de machine, il sera donc différent pour un tour numérique et pour une imprimante 3D.

Deux prototypes ont été conçus sur la base de deux imprimantes 3D à dépôt de filament (type FDM) du commerce, achetées en kit et, développés pour répondre aux exigences d'imprimabilité des produits carnés :

- Prototype 1 : Prusa i3 (Prusa, Prague, République Tchèque) – 500 €. La tête d'impression se déplace selon les axes x et z et le plateau en y (**Figure 1.3a**) ;
- Prototype 2 : Ghost (Jinhua Flyingbear Intelligent Technology, Jinhua, Chine) – 320 €. La tête d'impression se déplace selon les axes x et y. Le plateau d'impression assure le déplacement en z, laissant un espace suffisant pour accueillir une tête d'impression conçue sur mesure (**Figure 1.3b**).

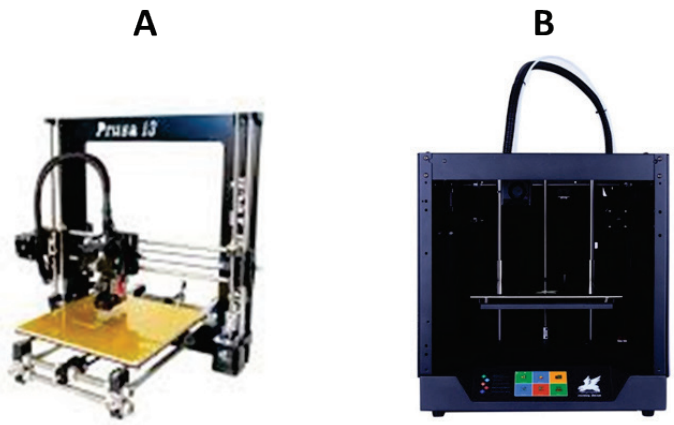


Figure 1.3. *Images des deux imprimantes 3D achetées en kit dans le commerce et qui ont été utilisées pour concevoir au laboratoire deux prototypes d'imprimantes 3D alimentaires : A – Imprimante Prusa i3 ; B – Imprimante Ghost, dans leur configuration d'origine.*

1.2.5.2. Imprimante 3D métal

L'I3D métal a été utilisée dans ce travail en tant que méthode de fabrication de pièces métalliques destinées au prototypage. Des pièces en acier inoxydable 316L (matériau compatible avec des applications agro-alimentaires), ainsi qu'en cuivre pour optimiser les transferts de chaleur, ont été

modélisées, puis fabriquées. L'I3D métal est déjà présente en industrie, mais son utilisation demeure encore confidentielle dans les laboratoires de recherche, notamment en raison de son coût (plusieurs centaines de k€). Cette technologie présente néanmoins plusieurs avantages en termes de résistance des matériaux ou de fabrication d'éléments conducteurs de chaleur.

Il existe différentes méthodes d'I3D métal (*cf*. **Chapitre 0**), seule celle utilisée dans le cadre de cette thèse est détaillée ici. Le procédé de fabrication est basé sur la technologie *Bound Metal Deposition* (BMD), elle-même inspirée de la technologie MIM (*Metal Injection Molding*) utilisée en industrie (hors systèmes d'I3D). Le procédé se divise en 3 étapes essentielles : l'impression 3D, le déliantage et le frittage (**Figure 1.4**), auxquelles d'ajoutent, bien évidemment, les étapes de conception (CAO et tranchage) et, éventuellement, de finition (post-traitement).

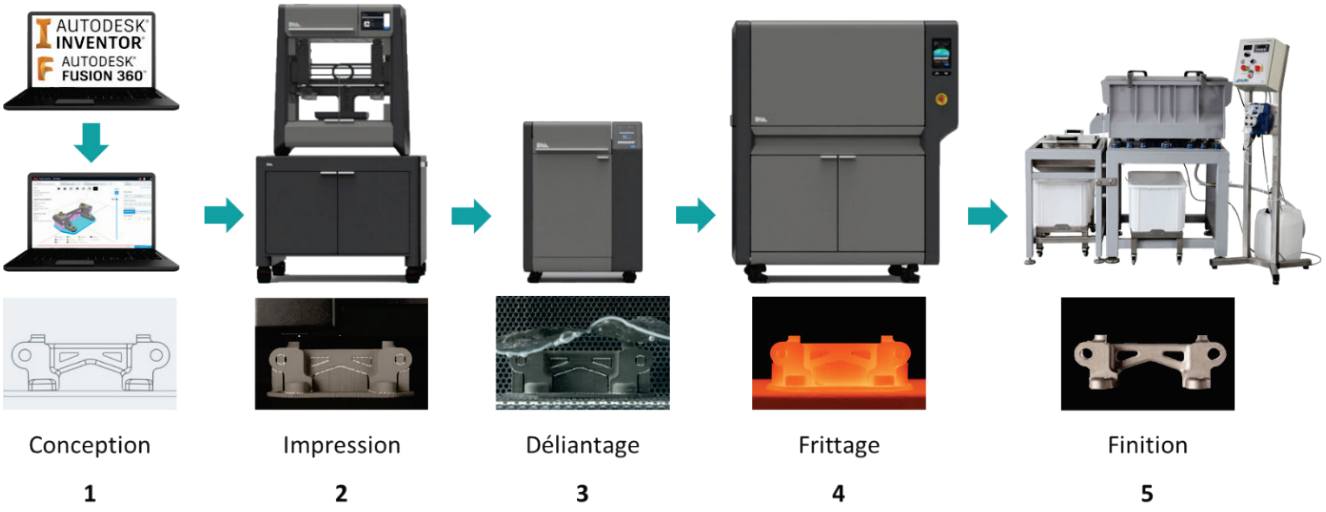


Figure 1.4. *Processus de conception, de fabrication et post-traitement d'une pièce métallique (acier inoxydable 316L) par impression 3D, selon la méthode BMD – Exemple de l'équipement Studio System+ (DeskTop Metal™) acheté au laboratoire.*

- ***Première étape : l'impression 3D***

Dans un premier temps, la matière va être déposée sur un plateau d'impression par extrusion à chaud au travers d'une buse. Cette étape est donc très proche d'une impression 3D à dépôt de filament (FDM) classique. Cependant, ici, la matière extrudée n'est pas du plastique, mais une poudre de métal mélangée à un liant polymère. En fin d'impression, une pièce dite « verte », fragile, composée de poudre métallique mélangée au liant, est obtenue. A ce stade de la fabrication et, à cause de la présence du liant qui va être éliminé lors des étapes suivantes, les dimensions de la pièce imprimée sont supérieures d'environ 20 % aux cotes réelles de l'objet dessiné par CAO. Cette valeur dépend du

matériau qui va être imprimé. Lors de la fabrication, une seconde tête d'impression permet de déposer des couches d'interface (en céramique) destinées à assurer des jonctions amovibles entre la pièce et son « *raft* » (ou « radeau »), ainsi qu'entre la pièce et ses éventuels supports (soutènement des géométries). Ce matériau céramique facilite ensuite le décollage de la pièce des éléments de fabrication (radeau, supports) en fin de frittage. Le « radeau » correspond à n couches de matériau imprimé (entre 3 et 5 mm d'épaisseur en fonction du volume de la pièce) ; il est destiné à assurer la stabilité de la pièce et à limiter les contraintes lors de l'étape de frittage. Les temps d'impression, par cette méthode, sont généralement plus longs que lors d'une impression polymère standard. Ceci est dû au procédé d'impression, qui, pour des raisons de consommation énergétique, stoppe le chauffage de la tête qui n'est pas sollicitée à l'instant t (matière ou interface). Pour des raisons d'abrasion différentes, il est nécessaire de dédier une tête d'impression à chaque matériau utilisé, notamment le cuivre et les différentes nuances d'acier inoxydable. En fonction de la précision recherchée pour la pièce, deux têtes, dont le diamètre des buses diffère, sont disponibles : précision standard (Ø 400 µm) et haute précision (Ø 250 µm). Le choix de la tête dépend de la précision recherchée. La tête « haute précision » a notamment été utilisée pour l'impression des buses d'extrusion (*cf*. 3.2.1.2). Toutefois, les pièces réalisables avec la tête haute précision doivent être de dimensions réduites (60 x 60 x 60 mm maximum) et la durée d'impression est beaucoup plus importante qu'avec la tête standard.

- ***Deuxième étape : le déliantage***

La deuxième étape consiste à retirer le liant polymère de la pièce, afin de ne garder que le métal : c'est l'étape de déliantage chimique. Pour cela, la pièce est immergée dans un solvant liquide (consommable propriétaire Desktop Metal™, USA) qui va dissoudre la quasi-totalité du liant. La durée du déliantage est directement corrélée à l'épaisseur des parois de la pièce imprimée. Etant donné que le solvant doit migrer au travers de chacune des parois, plus celles-ci sont épaisses et plus le temps de déliantage est long. Ceci est à prendre en compte lors de la conception, afin de privilégier des temps de déliantage compris entre 15 et 20 h. Cependant, des temps de 100 h peuvent être nécessaires dans certains cas. En revanche, des temps de déliantage encore plus longs impliquent que la conception de la pièce à imprimer doit être entièrement revue. À la suite du déliantage, une pièce dite « marron » est alors obtenue, qui est encore plus fragile que la pièce « verte » précédente, car très poreuse ; les propriétés mécaniques finales n'étant obtenues qu'après l'étape suivante de frittage.

- ***Troisième étape : le frittage :***

Cette troisième étape est la plus délicate. Elle va permettre de retirer le liant résiduel et, surtout, de souder les particules métalliques composant la pièce entre elles, par chauffage à haute température. Pour cela, un four programmable en température jusqu'à 1450 °C est utilisé. La pièce « marron » est introduite dans des compartiments en graphite, eux-mêmes placés dans l'enceinte du four. L'enceinte du four est alors mise sous-vide et un mélange gazeux d'argon et d'hydrogène (97,5 %/2,5 %) est injecté tout au long de la phase de frittage, afin de limiter l'oxydation du métal. Le débit du mélange gazeux est fonction du matériau utilisé ; par exemple, il est nettement supérieur dans le cas du cuivre par rapport à l'acier inoxydable. Pour des nuances d'acier au carbone ou, dans notre cas, pour le frittage du cuivre, l'utilisation de « *getter* » de frittage est indispensable lors du cycle de frittage. Il s'agit d'un matériau placé dans le four qui, aux températures de frittage, crée une atmosphère plus pure à l'intérieur du four, en agissant comme un matériau sacrificiel vis-à-vis des impuretés présentes dans l'atmosphère. Sans ce « *getter* » de frittage, les aciers au carbone peuvent avoir une teneur en carbone incorrecte après frittage et, le cuivre peut ne pas se densifier, selon les spécifications indiquées dans la fiche technique du fabricant du four. Le « *getter* » de frittage Desktop Metal® est un comprimé solide formé à partir d'une éponge pressée de zirconium et d'hafnium (> 0,2 %), ce qui le rend facilement manipulable.

La montée en température du four s'effectue par paliers, sur une durée de 40h, jusqu'à atteindre la température maximale d'environ 1450 °C (qui dépend du matériau) (**Figure 1.5**). Après refroidissement (environ une demi-journée), la pièce, qui possède les propriétés du métal utilisé avec une densité de 99,5 % minimum, peut être libérée de ses supports. En effet, les couches d'interface céramique, déposées lors de l'impression, ont été détruites au cours du frittage. La pièce s'est également rétractée en fonction du coefficient propre au matériau utilisé et les cotes définies lors de la CAO sont alors obtenues, avec une tolérance comprise entre ± 100 et 300 µm.

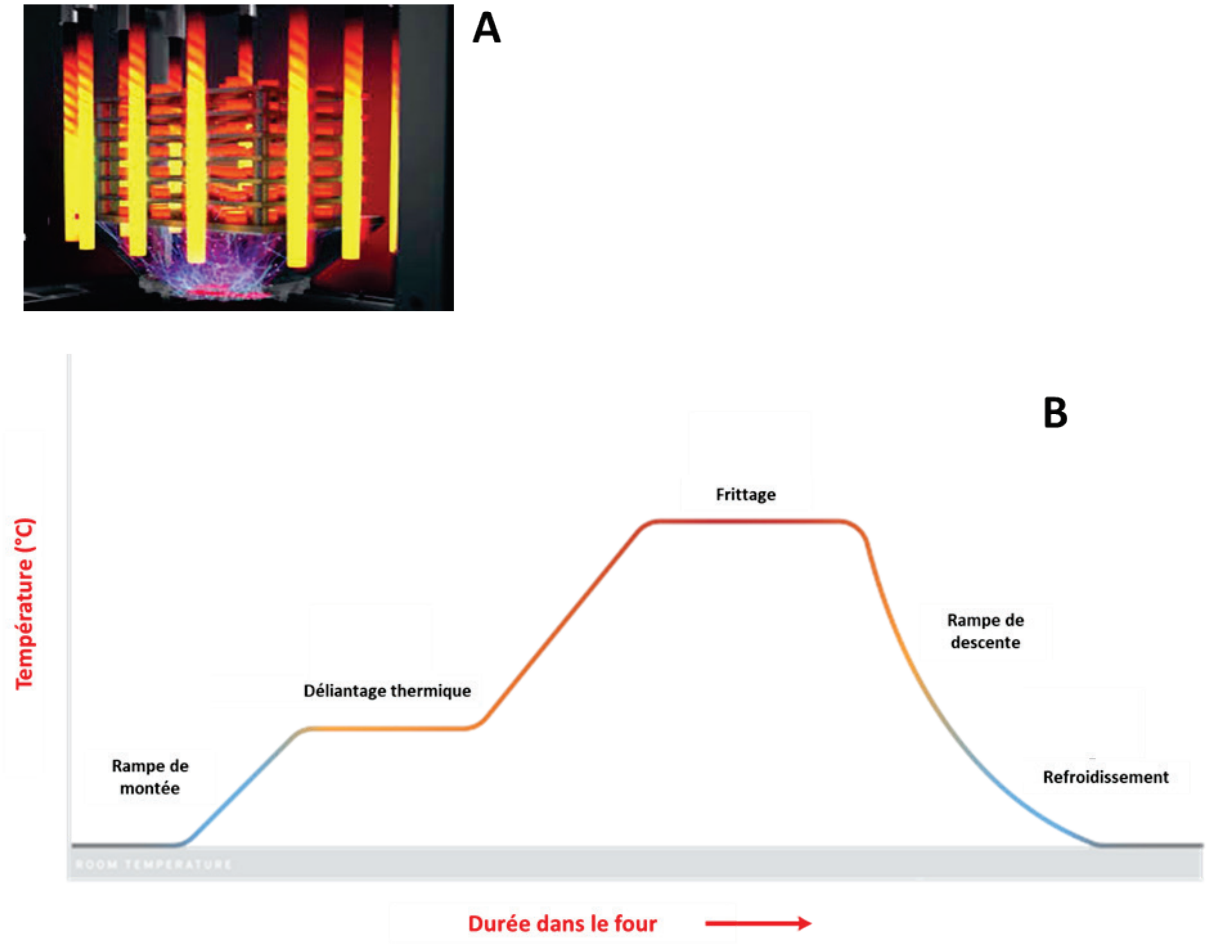


Figure 1.5. *Système d'impression 3D métal basé sur la technologie Bound Metal Deposition : A – Illustration du système de chauffage du four de frittage ; les pièces à traiter sont placées au sein d'un boîtier en graphite entouré de résistance chauffantes ; B – Cycle de température au cours de l'étape de frittage.*

La fabrication de pièces métalliques par cette technologie impose une conception différente par rapport aux imprimantes 3D polymères. En effet, les contraintes mécaniques imposées (**Figure 1.6**), lors de l'étape de frittage, peuvent déformer voire rompre, les pièces. De ce fait, la position définie lors de l'impression ainsi que la présence ou non de supports d'impression doivent être optimisées lors de chaque réalisation. Il peut même être parfois nécessaire de modifier la pièce (modification de la géométrie) pour la rendre compatible avec le procédé. Une reprise d'usinage, par des outils conventionnels, peut même être envisagée (tournage, fraisage, soudage).

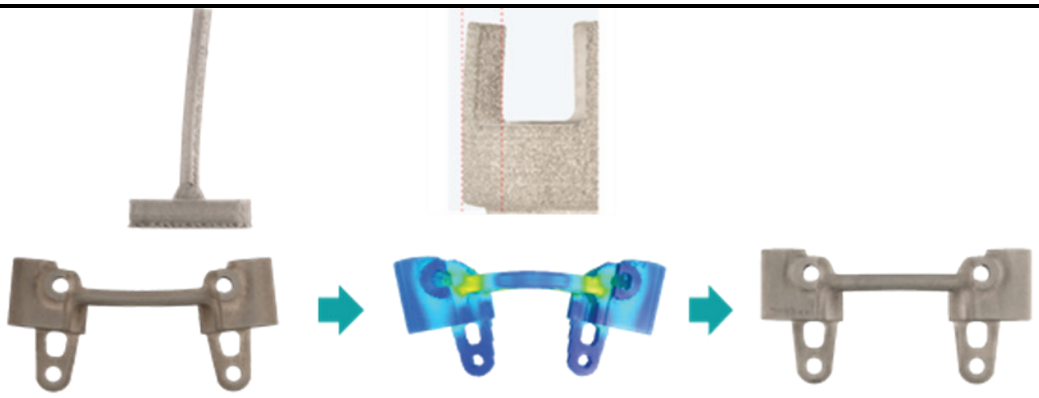


Figure 1.6. *Exemple de déformations possibles au cours de l'étape de frittage, la géométrie et la position des supports doivent être optimisées en amont.*

Le « radeau » nécessaire à la fabrication d'une pièce ainsi que les supports utilisés peuvent conduire à augmenter de façon significative la masse des pièces, dont une partie sera perdue (avec néanmoins une possibilité de recyclage selon les filières conventionnelles). L'utilisateur/concepteur peut alors être tenté de réduire ces quantités, voire « d'alléger » la pièce elle-même. La **Figure 1.7** illustre ceci et montre le résultat d'un défaut de matière sur l'intégrité de la structure obtenue. Les zones de vide étaient trop importantes, à la fois au niveau du « radeau » et de la pièce, pour résister aux contraintes thermiques.

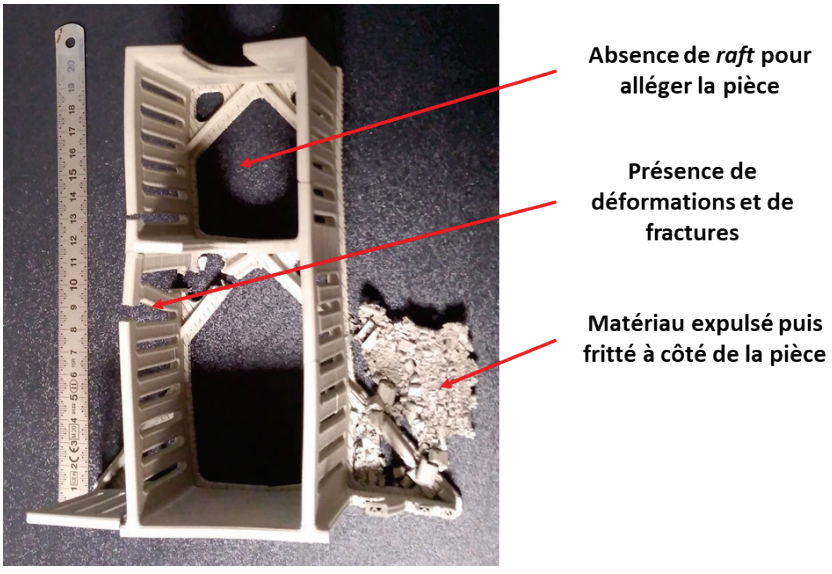


Figure 1.7. *Exemple de pièce ayant subi de fortes contraintes thermiques lors de l'étape de frittage, à cause d'un défaut de conception.*

L'aspect des pièces imprimées correspond à ce qui est appelé en mécanique du « brut ». Il peut donc être nécessaire d'effectuer une étape de finition pour : 1) la mise à la cote par usinage, ou

2) pour limiter l'apparition de biofilms bactériens, lors de la fabrication de pièces destinées à être en contact avec des aliments. Un ensemble d'outils et de méthodes sont donc nécessaires pour améliorer l'état de surface. Pour ce faire, un sablage à faible granulométrie et basse pression peut être appliqué avant la phase de déliantage sur la pièce « verte », afin de retirer une partie des strates de dépôt. Ensuite, l'utilisation d'un système de type « tribofinition », après l'étape de frittage, peut être utilisé pour ébavurer et amorcer le polissage des pièces. Dans notre système, ce procédé se déroule en trois phases, où chacune d'entre elles correspond à une action mécanique par frottement, sous vibration, conjuguant un abrasif céramique de granulométrie constante, mais de géométrie différente. Un détergent est ajouté pendant l'opération (dilué à 1 % dans l'eau). Chaque phase dure une dizaine d'heures (cela dépend du matériau et du résultat souhaité) (**Figure 1.8**). En effet, en fonction du résultat désiré, un polissage plus abouti peut être pratiqué, en utilisant, par exemple, des pâtes abrasives de granulométrie fine couplées à des disques de feutre.

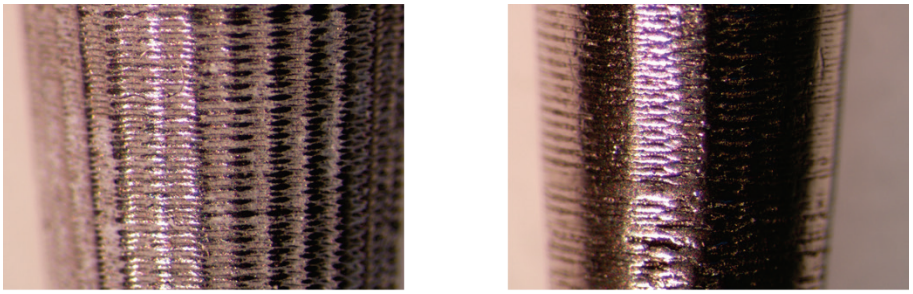


Figure 1.8. *Aspect de surface de pièces métalliques imprimées avec et sans post-traitement (post-traitement léger par tribofinition, uniquement). Grossissement x2.*

Comparativement à la fabrication de pièces en polymères thermoplastiques, le procédé d'impression 3D métal décrit ici présente davantage de contraintes, comme un temps d'impression plus long et la succession de 3 étapes durant chacune plusieurs heures. De ce fait, il est difficilement envisageable d'obtenir une pièce finie en moins de 7 jours. Le coût énergétique de l'étape de frittage n'étant pas négligeable (consommation de 90 kWh), il est donc conseillé d'effectuer cette étape avec un maximum de pièces dans le four, sans toutefois excéder 3 kg de matière, ce qui contribue aussi à allonger le temps total de fabrication.

1.3. Méthode de conception et résultats

Le développement de l'imprimante 3D alimentaire décrite dans ce chapitre a été réalisé en deux temps. Le premier a consisté en une preuve de concept, basée sur un premier prototype, afin de déterminer la faisabilité du système. Puis, en exploitant les manques et les limites du premier prototype, le second temps a permis le développement plus ciblé d'un nouveau prototype.

1.3.1. Conception du premier prototype d'imprimante 3D alimentaire

Ce premier prototype a été développé sur la base d'une imprimante 3D Prusa i3 (Portanguen et al., 2022). La principale modification a été apportée au niveau de la tête d'impression, afin de permettre l'extrusion de matrices biologiques. La plupart des têtes d'impression des imprimantes 3D commerciales utilisent des moteurs pas à pas pour extruder le filament. Cette technique peut être adaptée pour la mise en œuvre d'un pousse-seringue, en remplaçant le système d'entraînement du filament par un réservoir équipé d'un piston ou d'une vis sans fin. L'ensemble de la tête d'impression (destinée à l'extrusion de filaments polymères) a donc été retiré pour être remplacé par un nouvel ensemble composé des éléments suivants (**Figure 1.9** et **Figure 1.10**) :

- Une platine support imprimée en 3D destinée à accueillir l'ensemble des nouveaux composants de la tête d'impression ;
- Deux moteurs pas-à-pas (NEMA17) ;
- Deux pistons à vis équipés d'engrenages imprimés en 3D ;
- Deux vis sans fin, imprimées en 3D, destinées à la transmission entre les moteurs et les pistons ;
- Un support pour des seringues de 10 mL permettant de contenir les matières à imprimer ;
- Un capteur capacitif de proximité sans contact pour le réglage du point bas de la tête d'impression.

L'ensemble de ces éléments a été piloté à partir du logiciel Marlin (firmware).

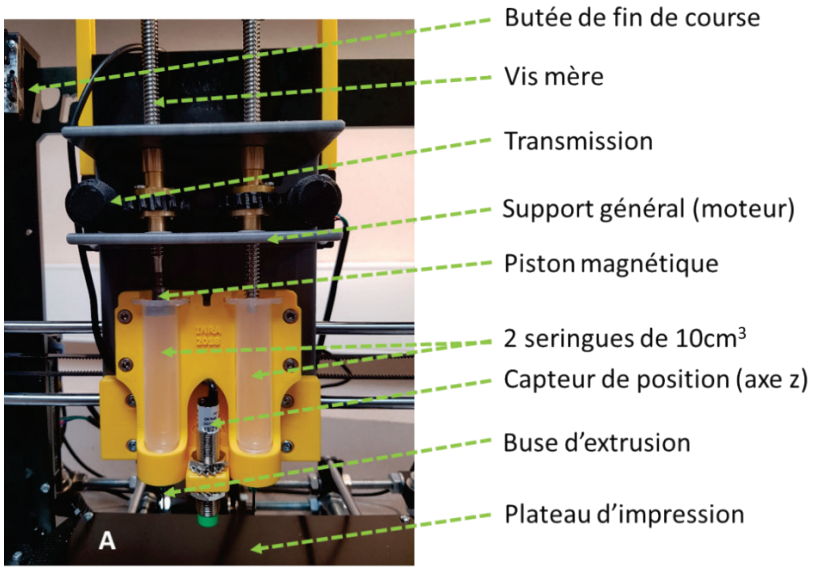


Figure 1.9. *Vue de la tête d'impression conçue pour l'extrusion de gels protéiques et installée sur le premier prototype d'imprimante alimentaire, développé à partir d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3).*

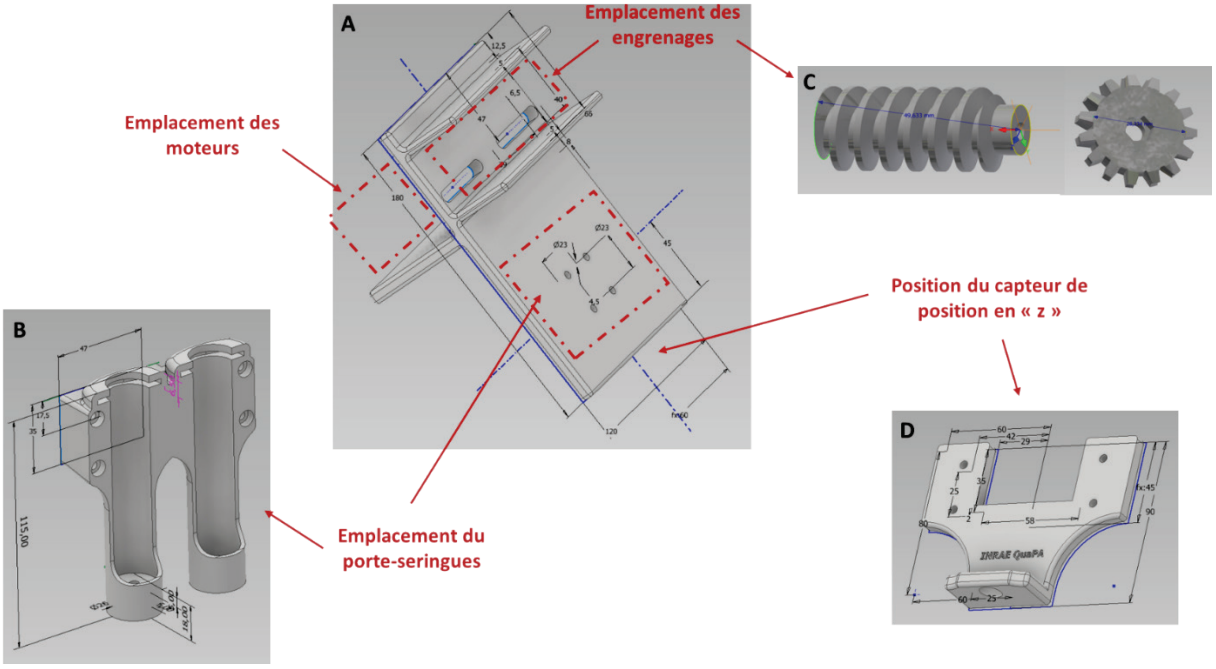


Figure 1.10. *Plans de conception de la tête d'impression développée et adaptée sur une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). A – Support global ; B – Dispositif porte-seringue ; C – Vis sans fin et pignon de transmission ; D – Support du capteur de position selon l'axe z.*

L'utilisation de ce premier prototype a permis d'identifier plusieurs problèmes en lien avec l'impression de gels alimentaires (**Tableau 1.2**). En premier lieu, l'ergonomie générale du dispositif était perfectible. Le remplissage des seringues était complexe, car le support imprimé (en jaune, sur la **Figure 1.9**) était parfaitement ajusté à la géométrie, afin d'avoir un bon alignement avec le piston.

Un joint amortisseur, imprimé en matériau souple (NinjaFlex, NinjaTek) avait été ajouté par souci d'étanchéité, de maintien de la seringue, mais aussi pour en permettre un démontage plus aisé. Le contrôle de la descente du piston était délicat, car très dépendant de la composition de la matrice utilisée et, donc difficilement répétable. Pour des gels relativement visqueux, la température de surfusion du gel est fondamentale, mais non contrôlable sur ce prototype, d'où des bouchages intempestifs et relativement fréquents de la buse. Le débit d'extrusion, essentiel pour respecter la géométrie prédéfinie, était très difficile à maintenir, notamment pendant les phases de changement de direction où un retrait de la matrice était nécessaire pour contrôler la position du dépôt. Malgré l'inversion de la rotation du moteur pour assurer le déplacement du piston, un écoulement résiduel de la matrice se produisait pendant plusieurs minutes en raison de la pression accumulée à l'intérieur de la seringue. Ceci rendait très difficile le contrôle de la géométrie de l'objet imprimé.

Tableau 1.2. *Principaux avantages et inconvénients liés à l'utilisation du premier prototype d'imprimante 3D alimentaire conçue au laboratoire sur la base d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3).*

Pièces d'origine[1]/Dispositifs modifiés[2]	**Avantages**	**Inconvénients**
Tête d'impression[2]	Double extrusion	Déplacement limité : 20 mm (axe z)
Extrudeur[2]	Design simple	Mauvaise rétractation
Porte-seringue[2]	Adapté au volume de l'aliment	Peu ergonomique
Plateau d'impression[1]	Pas de modification	Pas de refroidissement

Les gels imprimés, présentés sur la **Figure 1.11**, montrent la différence d'imprimabilité entre un gel de gélatine pur et un gel additionné d'alginates. En présence d'alginates, les structures présentaient une forme cohérente avec la géométrie modélisée par CAO. Ceci montre qu'il était, à ce stade du travail, impossible d'imprimer un gel de gélatine pur, sans avoir à ajouter un agent texturant tel que des alginates. Ceci est aussi révélateur d'un des principaux verrous rencontrés pour l'I3D de produits carnés et démontre la nécessité de parfaitement contrôler le procédé d'impression pour s'affranchir de l'utilisation d'additifs texturants.

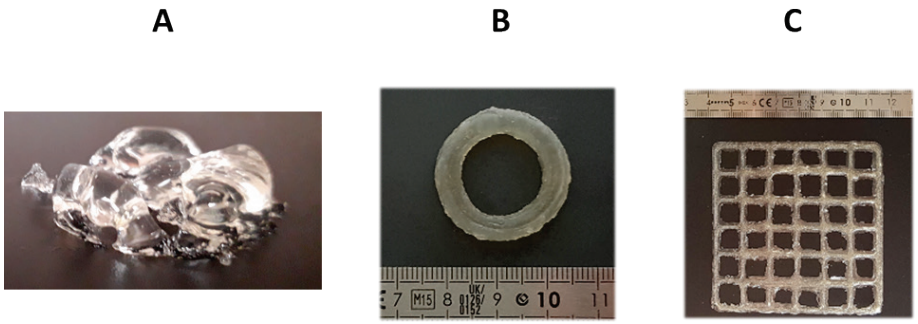


Figure 1.11. *Exemples de gels imprimés avec le premier prototype d'imprimante 3D alimentaire, conçu au laboratoire, sur la base d'une imprimante 3D du commerce (modèle Prusa i3). A – gel ne contenant pas d'alginates, B et C – gels contenant des alginates.*

1.3.2. Conception du second prototype d'imprimante 3D alimentaire

Pour s'affranchir des limitations rencontrées avec le premier prototype d'imprimante 3D alimentaire, nous avons décidé d'acquérir un autre modèle qui offrait un déplacement beaucoup plus important selon l'axe z et, capable de supporter une tête d'impression plus encombrante et plus lourde. Notre choix s'est porté sur une imprimante de type *Ghost* de chez *FlyingBear*, qui est commercialisée en kit et qui offre l'avantage d'être facile à modifier.

Dans l'optique de développer ce second prototype d'imprimante 3D alimentaire, plusieurs éléments ont été supprimés, modifiés ou ajoutés à cette imprimante, afin d'en simplifier ou d'en optimiser l'utilisation. L'intégration de toutes ces modifications a, cependant, demandé un travail conséquent pour que l'ensemble communique parfaitement avec le logiciel de pilotage (**Figure 1.12**). Les modifications ont été apportées à trois parties essentielles du système d'impression, que sont 1) la tête d'impression, où le système d'extrusion a été totalement repensé ; 2) le plateau d'impression, de façon à ce qu'il soit désormais régulé en température (entre 0 et 20 °C) et, 3) le bloc électronique de l'imprimante**.**

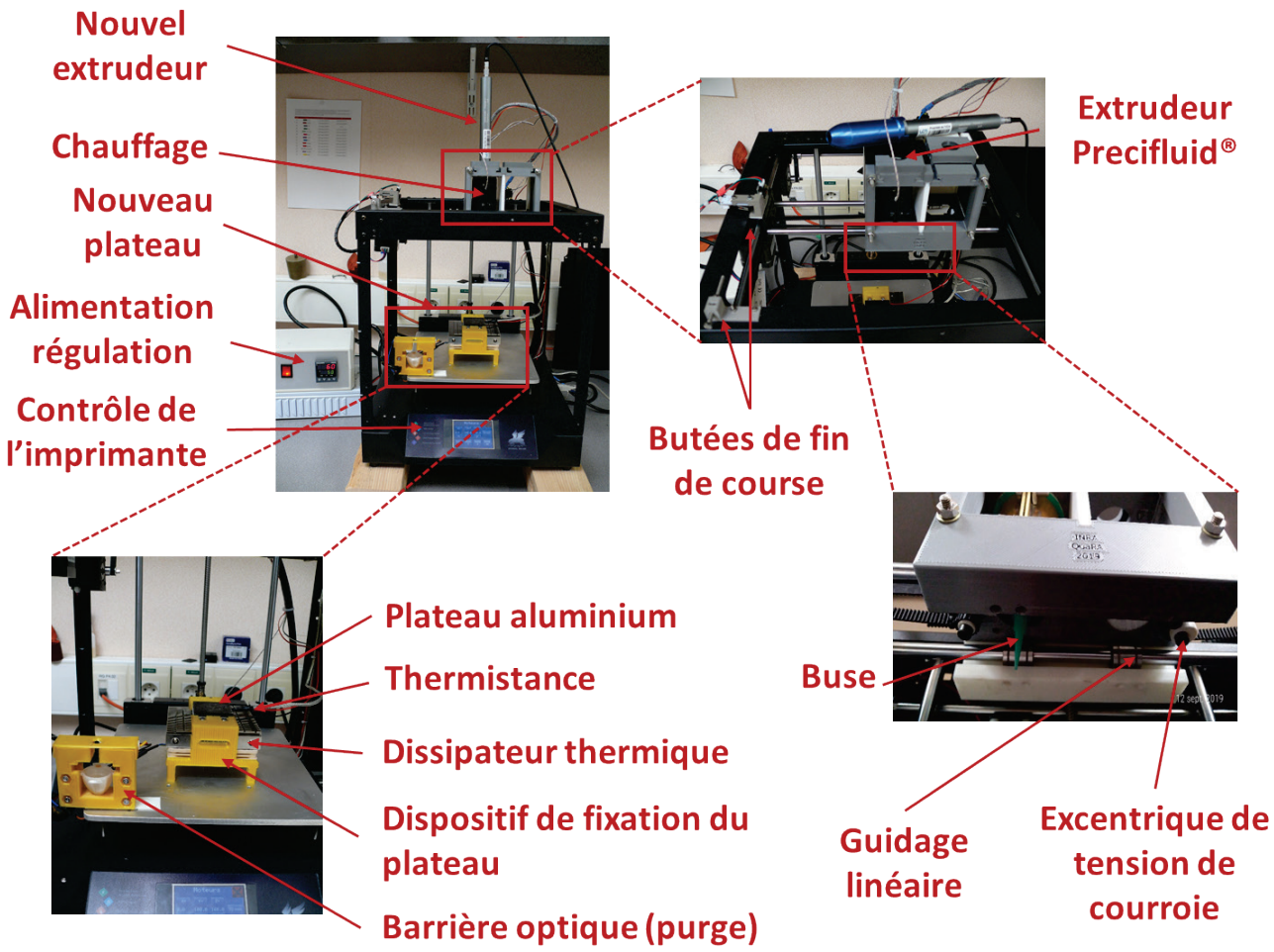


Figure 1.12. *Vues des principales modifications apportées (tête et plateau d'impression) à l'imprimante 3D Ghost achetée dans le commerce (à comparer avec la Figure 1.3a) pour le développement du second prototype d'imprimante 3D alimentaire.*

1.3.2.1. Modifications apportées à la tête d'impression

Le débit d'impression est une variable fondamentale pour obtenir une extrusion correcte. Dans notre configuration de travail, ce débit est déterminé, à la fois, par le « trancheur » (*slicer*) du logiciel et par l'opérateur. Dans le trancheur, le débit est calculé en fonction de la géométrie, de la largeur de la ligne de dépôt et de la taille de la buse. Le débit est donc directement corrélé avec le mouvement de la tête d'impression. En adaptant la vitesse de déplacement de la tête, l'extrusion peut être optimisée de façon à assurer le dépôt et la bonne quantité de matière par unité de longueur. Normalement, aucun ajustement du débit n'est nécessaire, notamment lors de l'impression de polymères, pour laquelle, le logiciel utilisé est parfaitement adapté. Cependant, les gels se comportant différemment des polymères, des ajustements manuels du débit sont parfois nécessaires pour assurer la cohésion entre les couches, en fonction de l'épaisseur de la paroi, de la hauteur de la couche, du

taux de remplissage, *etc.* Ceci est géré en ajustant manuellement le paramètre du multiplicateur d'extrusion, qui permet le réglage fin du débit et qui est disponible dans le *slicer* CuraEngine du logiciel Repetier-Host.

1.3.2.1.1. Intégration physique du système d'extrusion

Pour l'extrusion par compression, nous avons fait le choix d'utiliser un doseur volumétrique de marque Precifluid® (**Figure 1.13**). Ce doseur, très précis, permet des déplacements minimums de son poussoir de 110 nm. Il est aussi très compact, car utilise un moteur pas à pas linéaire non rotatif. Celui-ci peut être inséré facilement dans une tête d'impression. Ce type de doseur volumétrique est largement utilisé en laboratoire, car il est capable de fournir un couple très important et, fonctionne pour la plupart des liquides, qu'ils soient de faible ou de forte viscosité (poussée maximale de 500 Pa.s[2]). Il est à noter que ce doseur permet le dépôt de liquide grâce à sa vis sans fin qui pousse mécaniquement le piston d'une seringue de 10 cm^3 (volume utile de 9,8 cm^3). Il est également possible de faire remonter ce piston sans contact direct, grâce à un anneau magnétique placé autour de la seringue et coulissant avec la vis sans fin. Le volume délivré par tour de vis « *step* » est de $4{,}73.10^{-4}$ cm^3, pour un volume minimal délivré de $6{,}00.10^{-5}$ cm^3 (0,06 µL).

Figure 1.13. *Le système Precifluid®. A – Vue extérieure et, B – Principales caractéristiques du système Precifluid® utilisé pour déposer le matériau alimentaire sur le plateau d'impression du second prototype d'imprimante développé au laboratoire.*

L'intégration du doseur volumétrique Precifluid® a été complexe, car il s'agit d'un matériel indépendant, conçu pour être utilisé avec un boitier de contrôle autonome commandé par une pédale

mécanique. En aucun cas, il n'avait été imaginé et configuré pour être intégré dans un système électromécanique externe.

La nouvelle tête d'impression a été réalisée, en intégrant le doseur volumétrique présenté précédemment. La **Figure 1.14** indique l'emplacement de ce doseur, placé au-dessus de la tête d'impression, assurant le maintient la seringue contenant le gel, par encastrement. L'ensemble constitué par le doseur et la seringue a été inséré dans un manchon en aluminium usiné aux dimensions de la seringue (**Figure 1.14**). Ce support comporte une partie cylindrique englobant le corps de la seringue et une partie conique, qui vient se visser sous la partie cylindrique et qui englobe l'embout de la seringue, ainsi que la buse d'extrusion.

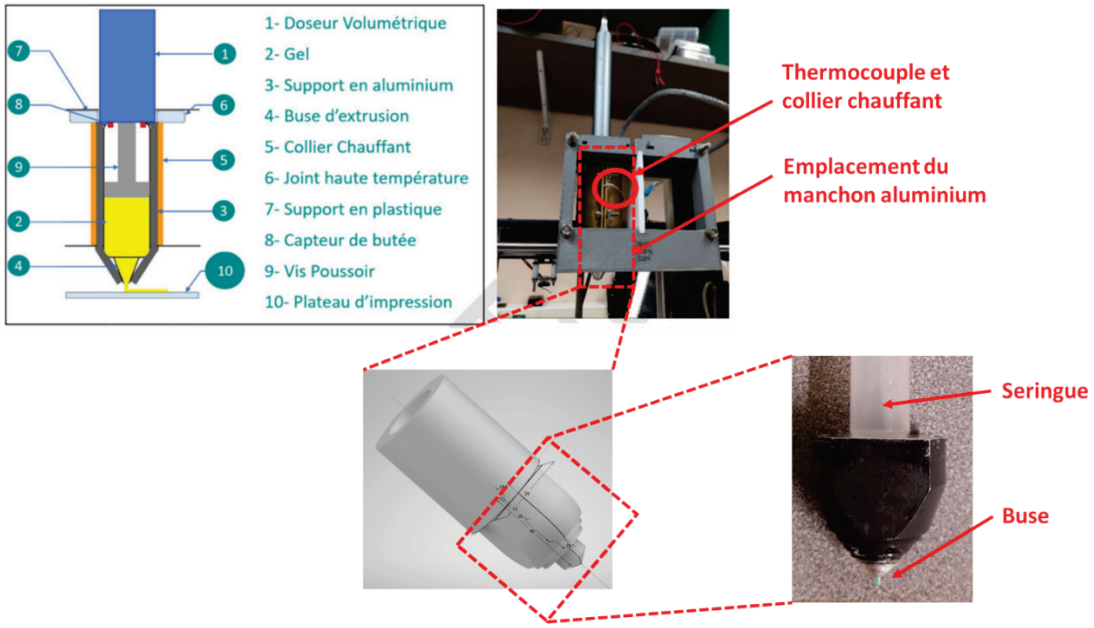


Figure 1.14. *Vues détaillées du manchon conducteur en aluminium et du collier chauffant qui ont été installés sur le second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire.*

L'utilité de ce support est double : d'une part, il sert à maintenir en position le doseur volumétrique et, d'autre part, il permet un transfert d'énergie par conduction depuis le collier chauffant qui l'entoure vers la seringue contenant le matériau à imprimer, car ce support relie ces deux éléments du système d'impression. Cela permet un chauffage plus uniforme que si le collier était directement en contact avec la seringue. Un joint résistant aux hautes températures a été placé au-dessus du support et du collier chauffant, afin d'empêcher toute diffusion de chaleur et donc tout risque de détérioration du support en plastique et surtout, du moteur du doseur volumétrique (**Figure 1.14**). Le collier chauffant est alimenté électriquement et embarque un thermocouple qui

permet de réguler la température du contenu de la seringue, par un algorithme de type PID[7]. Cependant, la température réelle de la seringue et du gel qu'elle contient n'est pas mesurée directement, car elle supposée égale à la température du collier chauffant (un temps d'équilibre est imposé avant l'impression). La tête d'impression est placée dans un support réalisé par I3D et, fixé au dispositif de guidage des axes x et y (**Figure 1.14**). Ce support a été conçu, afin de pouvoir accueillir deux têtes d'impression, ce qui permettra de réaliser, à terme, des impressions bi-composants (**Figure 1.15**).

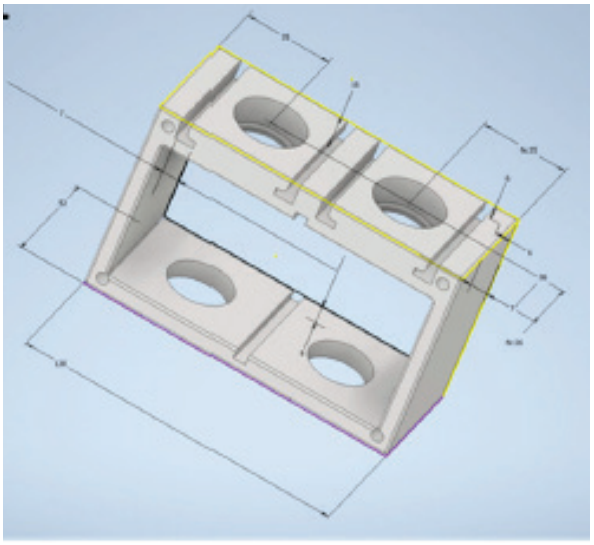


Figure 1.15. *Modélisation par CAO du support d'extrudeur comprenant deux emplacements possibles, destinés à recevoir deux têtes d'impression, en vue de réaliser une impression bi-composants.*

1.3.2.1.2. Conception de nouvelles buses métalliques

Pour l'impression de gels en surfusion, l'utilisation de buses du commerce s'est avérée compliquée. Il est, en effet, nécessaire de maintenir une température stable dans l'ensemble du système d'extrusion. Or, l'ensemble des buses ou aiguilles du commerce adaptables sur des seringues étaient soit en plastique, soit possédaient une partie isolante. Cela avait pour conséquence de créer un point froid et ainsi de refroidir le gel, très localement, en sortie de buse, provoquant des bouchons qui nécessitaient, dans la plupart des cas, de démonter l'extrudeur. La conception puis la fabrication de buses adaptées par I3D métal ont permis de pallier cet inconvénient (**Figure 1.16**). Enfin, l'utilisation d'acier inoxydable 316L (acier austénitique offrant une grande résistance à la corrosion) lors de l'I3D

[7] Le régulateur PID, appelé aussi correcteur PID (proportionnel, intégral, dérivé) est un système de contrôle permettant d'améliorer les performances d'un asservissement, c'est-à-dire un système ou procédé en boucle fermée.

permet de concevoir des pièces parfaitement compatibles avec le contact alimentaire. A terme, l'ensemble des éléments nécessaires à l'extrusion et au dépôt de matériaux alimentaires sera imprimé dans ce matériau.

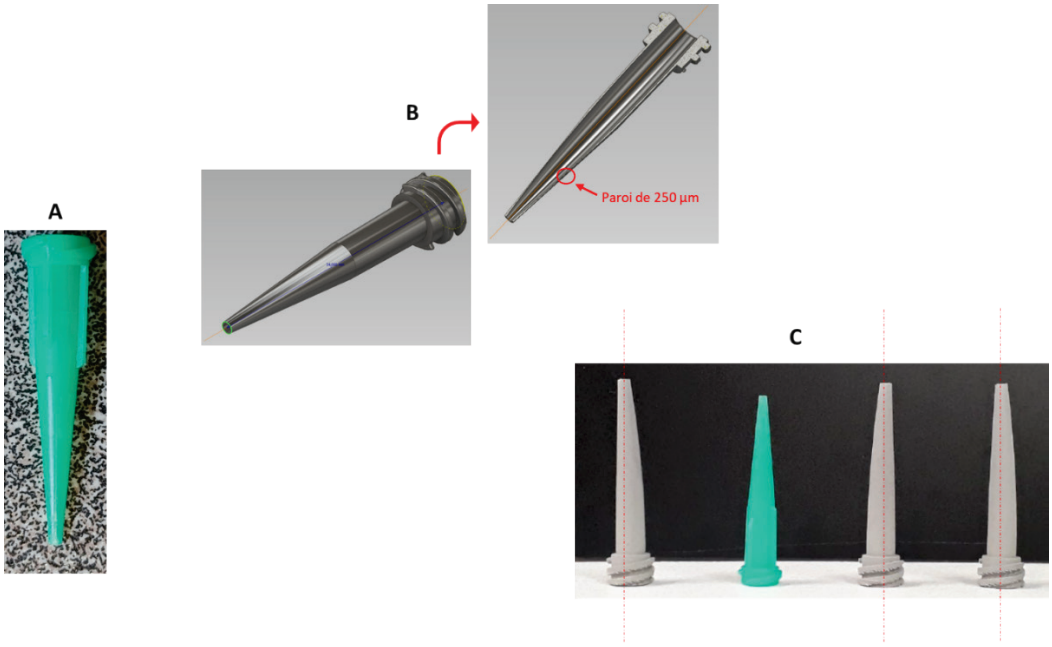


Figure 1.16. *Conception et fabrication de buses d'extrusion métalliques. A – Exemple de buse en plastique du commerce ; B – Buse modélisée par CAO, et C – résultats d'impression de buses au moyen de l'imprimante 3D métal.*

La **Figure 1.16** montre des buses imprimées en métal, comparativement à une buse en plastique fabriquée par un procédé classique d'injection. Sur cette figure, nous pouvons remarquer que les contraintes provoquées par le frittage provoquent une légère inclinaison, surtout dans leur partie correspondant aux 2/3 supérieurs. Ceci est dû à l'épaisseur des parois dans la partie conique des buses. Sur la vue en coupe de la **Figure 1.16b**, nous pouvons voir que l'épaisseur de paroi est cotée à 0,25 mm pour correspondre, à la fois, aux dimensions de la buse en plastique, mais également pour pouvoir être placée dans le manchon chauffant. Or, cette dimension correspond à la limite de résolution de l'imprimante métal, même en utilisant la tête d'impression haute résolution.

Dans le **Chapitre 3**, une autre série de buses a été fabriquée afin d'être adaptée sur un simulateur d'extrusion, mais cette fois, les cotes externes ont pu être augmentées d'un facteur 4 de façon à éviter toute déformation lors de l'impression métal. La différence de structure est visible sur la **Figure 1.17**.

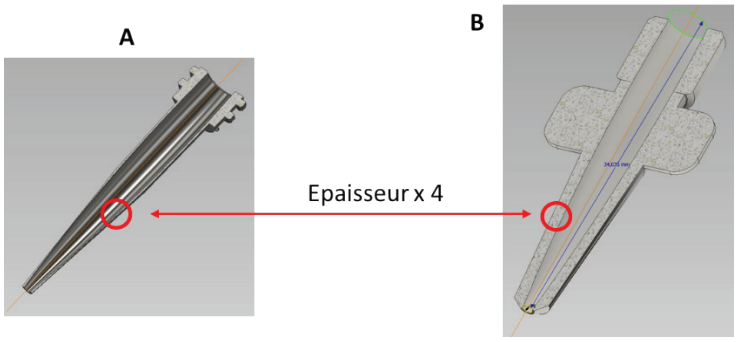


Figure 1.17. *Vue en coupe de buses modélisées par CAO : A – buse d'extrusion, dont la paroi a une épaisseur de 0,25 mm ; et B – buse d'extrusion, dont la paroi a été renforcée à 1 mm d'épaisseur, de façon à éviter toute déformation lors de l'impression 3D métal.*

Une reprise d'usinage a été nécessaire pour respecter la cote finale. En effet, le procédé BMD utilisé par l'I3D métal a une tolérance pouvant aller jusqu'à 0,3 mm. Les limites de cette tolérance sont illustrées sur la **Figure 1.18**, qui montre qu'une reprise de perçage a été nécessaire de façon à se conformer au plan initial où le diamètre de l'orifice de la buse avait été fixé à 1 mm.

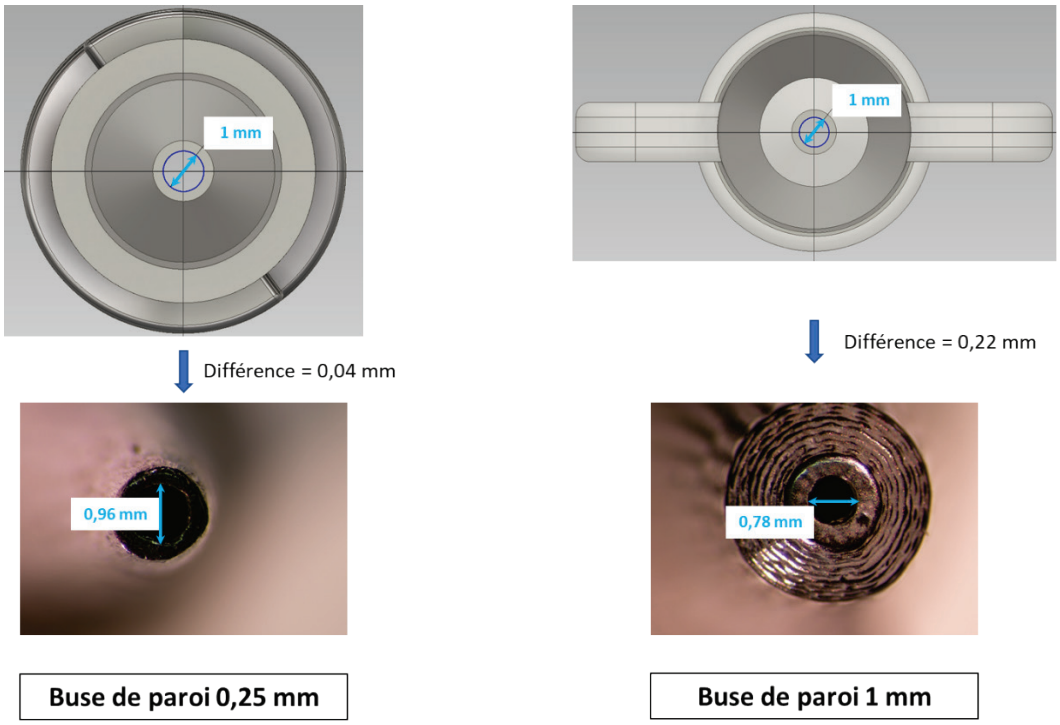


Figure 1.18. *Mesure, au moyen d'un stéréomicroscope, du diamètre de buses d'extrusion imprimées en inox 316L. Les écarts mesurés entre les cotes du modèle CAO et les mesures expérimentales sont indiqués. A – buse avec une paroi de 0,25 mm d'épaisseur ; B – buse avec une paroi renforcée de 1 mm d'épaisseur.*

1.3.2.2. Modifications apportées au plateau d'impression

1.3.2.2.1. Intégration et contrôle du module à effet Peltier

Le plateau d'impression d'origine de l'imprimante Ghost a été remplacé par une plaque en aluminium de 5 mm d'épaisseur, de façon à faciliter l'intégration de nouveaux éléments. Pour rappel, à la différence du premier prototype développé sur la base d'une imprimante Prusa i3, le plateau de la Ghost se déplace selon l'axe z. Sur cette plaque, a été fixé un dispositif imprimé en PETG (Polytéréphtalate d'éthylène Glycol) conçu pour recevoir un module à effet Peltier de 51,4 W (Laird Technologies, Chesterfield, MO, USA) reposant sur un dissipateur thermique (bloc réfrigérant NH-L9i, Noctua, Vienne, Autriche), de façon à limiter la surchauffe du système (**Figure 1.19**). Ce dissipateur thermique a été équipé d'un ventilateur électrique de 12 V, dont le débit est de 1,61 $m^3.min^{-1}$ (**Figure 1.19ac**). La surface d'impression est de 16 cm^2 et dépend directement de la taille du module à effet Peltier. Sur ce module, a été positionnée une plaque d'aluminium de 5 mm d'épaisseur et de section 40 × 40 mm, ce qui permet d'assurer une conduction thermique optimale. Une rainure de 3,5 mm de profondeur a été usinée au centre de cette plaque, afin d'y sceller, à l'aide d'une résine conductrice chargée à 80 % de particules d'aluminium, une thermistance de 100 kΩ (Zhuhai Bell Technology, Zhuhai, Chine) aussi près que possible de la surface d'impression. La thermistance, dont la précision était de ±0,5 °C, a été calibrée en cinq points entre 0 et 100 °C, à l'aide d'une sonde de référence en platine (modèle Testo 735, Testo, Lenzkirch, Allemagne). Le contact entre la plaque d'aluminium et le module Peltier a été assuré, d'une part, par la fixation au dispositif imprimé en PETG jaune (**Figure 1.19**) et, d'autre part, au moyen d'une couche de graisse conductrice. Le module Peltier est contrôlé par une carte Arduino à l'aide d'un algorithme PID, afin de limiter les éventuelles perturbations de température induites, par exemple, par le dépôt de gel chaud (*cf*. 3.3.1.2). L'alimentation du module Peltier est assurée par le découpage d'une tension de 12 V issue d'une alimentation externe (12 V, 33 A) capable de délivrer une puissance bien supérieure à celle consommée par le module Peltier. Le découpage de la tension 12 V, par la carte Arduino, à partir du résultat de l'algorithme de régulation PID, a permis de faire varier la tension moyenne d'alimentation du module Peltier entre 0 et 12 V, permettant ainsi d'optimiser le refroidissement pour atteindre la consigne de température désirée.

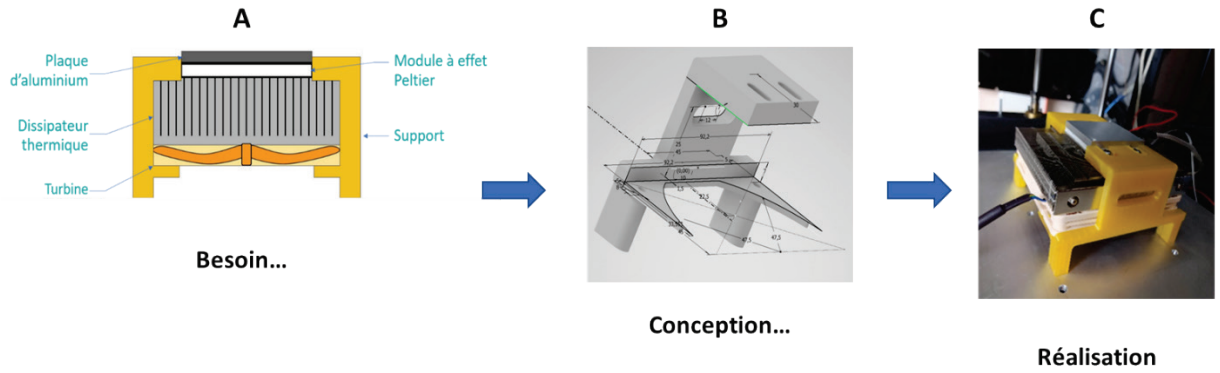


Figure 1.19. *Détails du système de plateau d'impression refroidi, spécialement conçu pour le second prototype d'imprimante 3D alimentaire développée au laboratoire. A – Vue en coupe du projet de plateau d'impression refroidi ; B – Vue du plan de conception et, C – Vue du dispositif fixé sur le plateau de l'imprimante.*

Le module de refroidissement à effet Peltier est une plaque de 3,5 mm d'épaisseur qui, lorsqu'il est soumis à un courant électrique, va réaliser un transfert de chaleur entre ses deux faces. Il est, en réalité, composé de deux fines plaques reliées par un semiconducteur ondulé. Sous l'effet du courant électrique, les électrons vont jouer le rôle de fluide caloporteur et transférer l'énergie thermique d'une face vers l'autre. Toutefois, l'énergie thermique créée sur la face dite « chaude » est supérieure à l'énergie thermique prélevée sur la face dite « froide ». Ce type de module présente un mauvais rendement pour le refroidissement d'importants volumes d'air, mais convient parfaitement pour ce type d'application, notamment grâce à un temps de réponse très court. L'intensité du courant fourni au module de refroidissement induit une différence de température entre les faces chaude et froide et, le contrôle de ce courant permet de gérer la différence de température entre les deux faces. Il est alors essentiel de garder la face chaude à une température constante, a plus basse possible, pour pouvoir contrôler avec précision la température de la face froide et, limiter la conduction entre les deux faces. En effet, si la température de la face chaude augmente trop, la conduction entre les deux faces pourrait contrebalancer l'effet Peltier. Si cela devait arriver, les deux faces se réchaufferaient, provoquant un emballement thermique, pouvant mener à la destruction du module Peltier. Pour ces raisons, il était essentiel d'évacuer la chaleur produite sur la face chaude, à l'aide d'un dissipateur thermique.

1.3.2.2.2. Conception de la barrière optique

Avant chaque impression, une phase d'initialisation du système Precifluid® est programmée pour purger la seringue, éliminer les éventuelles bulles d'air dues à son remplissage, et aussi, pour

éviter tout colmatage en sortie de buse. Les volumes imprimés étant faibles, le volume d'une bulle d'air peut être supérieur au volume de la première couche d'impression. Cela signifie que cette première couche ne sera pas imprimée, donc l'intégrité de la géométrie de l'ensemble de l'aliment sera compromise. Pour éviter cela, la purge est assurée automatiquement par l'utilisation d'une barrière optique (**Figure 1.20**).

Une barrière optique est composée d'un émetteur qui va envoyer un rayon de lumière et, d'un récepteur qui va capter ce rayon. Lorsque le faisceau optique est coupé, le rayon lumineux n'est plus perçu par le récepteur et, un signal est transmis. L'émetteur se compose d'une diode laser (de longueur d'onde 700 nm) et, le récepteur, d'une cellule photovoltaïque. Le seuil de détection du fluide par la barrière optique a été déterminé expérimentalement de façon à optimiser l'élimination des bulles d'air, tout en minimisant la perte en gel. Pour maintenir les capteurs face à face, un support a été imprimé en 3D en PETG (**Figure 1.20a**). Ce support est composé de deux pièces principales en forme de « C » et d'un chapeau (**Figure 1.20b**). L'émetteur laser et le photorécepteur sont positionnés dans les emplacements prévus à cet effet sur les deux pièces principales. Les connecteurs des deux capteurs passent par des ouvertures rectangulaires (entourées en rouge) de chaque côté du chapeau (**Figure 1.20b**). Leur position empêche de retirer le chapeau tant qu'ils ne sont pas déconnectés, afin d'interdire le démontage du support, alors que la barrière est encore active. Le support est conçu pour accueillir un gobelet prévu pour recevoir le gel passant entre les deux capteurs de la barrière.

Lors de la purge de la seringue, la tête d'impression est placée au-dessus de la barrière optique (en butée sur les axes x et y). L'émetteur laser est activé et, la vis-poussoir du doseur volumétrique descend. Ce mouvement va expulser l'air de la seringue jusqu'à ce qu'elle soit totalement purgée, entrainant l'extrusion du gel qui va couper le rayon optique, avant d'être récupéré dans le gobelet. Lorsque le rayon optique est coupé, le poussoir s'arrête afin de maintenir le gel dans un état compressé, empêchant la formation d'une nouvelle bulle d'air. La seringue est ainsi prête à être utilisée pour une impression et, l'extrusion de gel sera immédiate (**Figure 1.20c**).

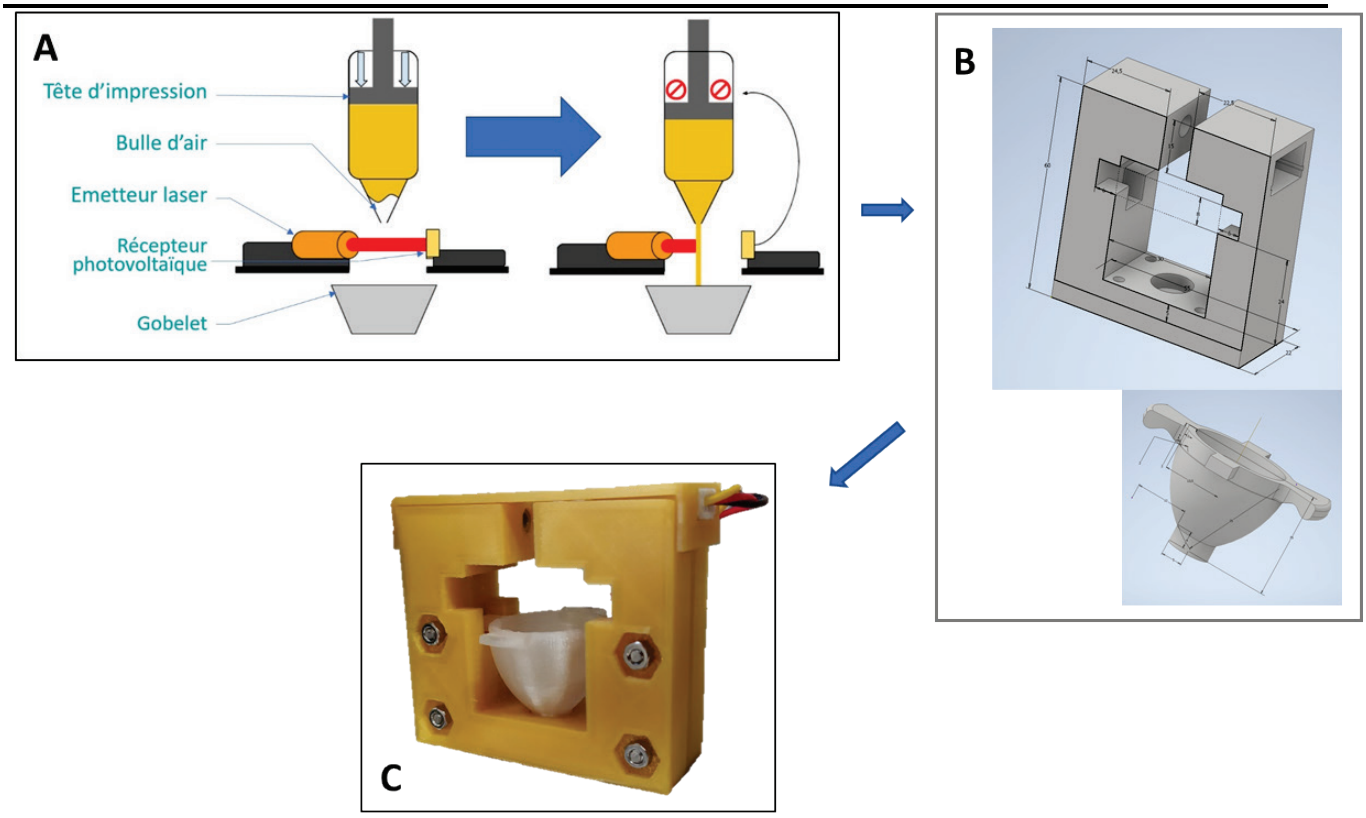


Figure 1.20. *Barrière optique permettant la purge automatique du Precifluid®. A – représentation schématique du fonctionnement de la barrière optique, B – plan de conception et, C – la barrière optique imprimée en 3D.*

Le plus complexe dans la réalisation de cette barrière optique a été de déterminer son seuil d'activation. En effet, le photorécepteur n'envoie pas un signal numérique lorsqu'il ne perçoit plus le laser de l'émetteur, mais envoie constamment une valeur analogique inversement proportionnelle à la lumière perçue. Cette lumière peut être due au rayon laser, mais aussi à la luminosité ambiante. Pour éviter toute influence de la luminosité ambiante, l'émetteur et le récepteur ont été placés très proches l'un de l'autre, à moins de 10 mm. Ainsi, lors de son activation, le rayon lumineux émis par la diode laser sature le photorécepteur, qui renvoie une valeur constante minimale, inversement proportionnelle à la quantité de lumière. Lors de la coupure du faisceau lumineux de la barrière optique par un fluide, cette valeur sera légèrement modifiée et, dépassera un seuil déterminé expérimentalement, à partir duquel il est considéré que le rayon optique est coupé.

1.3.2.2.3. Etalonnage du plateau d'impression

Avant chaque utilisation, la position de la plaque d'impression est calibrée. Cette calibration est réalisée en sollicitant le *firmware* « Marlin » de la carte mère, en lui envoyant la commande G-Code G29. A partir de cette commande, « Marlin » prend entièrement en charge la calibration de la plaque

d'impression. Cette calibration consiste à déplacer le capteur de la position 0 de l'axe z de la tête d'impression en neuf points répartis régulièrement sur la surface de la plaque et, à mesurer la déviation par rapport à la position z=0. Grâce à la correction automatique effectuée par le *firmware* « Marlin », cette calibration permet d'éviter les défauts horizontaux de la plaque et, donc de garantir une hauteur d'impression identique sur toute sa surface.

1.3.2.3. Modifications électroniques et communication au sein de l'imprimante

Afin d'éviter d'ajouter des contraintes ou des modifications majeures à la carte mère existant dans l'imprimante *Ghost*, une nouvelle carte électronique de contrôle a été ajoutée. La communication entre les deux cartes est essentielle pour synchroniser les actions de chacune. Cette démarche a permis l'intégration de nouveaux éléments matériels, comme le système de dosage volumétrique, la régulation thermique de ce système de dosage, le module de refroidissement par effet Peltier, une série de capteurs servant au contrôle et au pilotage, ainsi que la barrière optique (**Figure 1.21**).

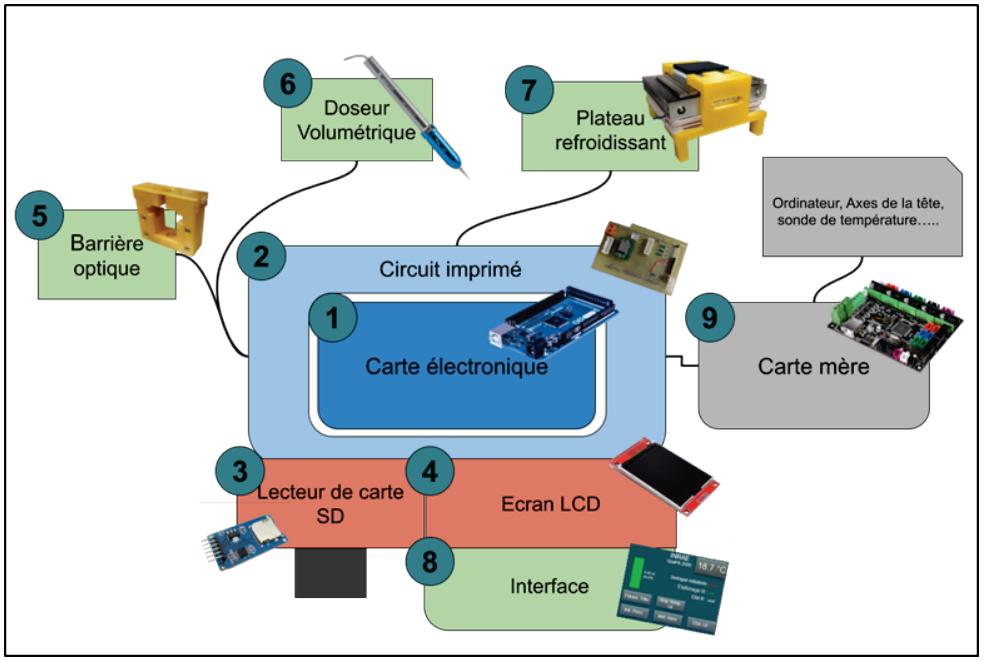


Figure 1.21. *Représentation schématique des différents organes ajoutés lors du développement du second prototype d'imprimante 3D alimentaire et, de leurs liens avec le bloc électronique. 1) Carte électronique ; 2) Circuit imprimé (interfaçage de la carte électronique) ; 3) Lecteur de carte SD pour la gestion de l'interface « Homme-machine » ; 4) Ecran tactile LCD ; 5) Barrière optique pour la purge du doseur volumétrique ; 6) Doseur volumétrique Precifluid® ; 7) Plateau refroidissant par système à effet Peltier ; 8) Interface « Homme-machine » ; 9) Carte mère d'origine de l'imprimante.*

La nouvelle carte électronique (carte microcontrôleur de type Arduino Mega 2560 programmée en langage C) a été associée à un circuit imprimé, dont le rôle est d'interfacer la carte avec le reste des éléments et de permettre le positionnement des composants électroniques. L'ajout de cette carte permet de contrôler facilement et de manière personnalisée ces nouveaux éléments, sans avoir à modifier lourdement le *firmware* (logiciel intégré à la carte mère pour la piloter) de la carte mère, qui est complexe et optimisé pour une utilisation « normale » de l'imprimante. Cette carte propose un grand nombre de connexions d'entrées-sorties (68 différentes), aussi bien numériques qu'analogiques, ainsi que plusieurs liaisons séries. Ainsi, il sera possible d'ajouter d'autres éléments à l'imprimante sans être limité par cette carte, notamment un second extrudeur ou un dispositif de post-traitement.

1.3.2.3.1. Communication avec la carte mère

Le remplacement de l'écran de l'imprimante par un autre écran, géré par la carte électronique, a permis d'utiliser les connecteurs de l'ancien modèle. En effet, celui-ci communiquait avec la carte mère par une liaison série UART (*Universal Asynchronous Receiver-Transmitter*). Ce type de communication nécessite deux fils de données : un fil pour l'émission d'octets (TX) et un autre pour la réception (RX) : il est possible d'envoyer et de recevoir des données en même temps (liaison asynchrone). Un troisième fil est utilisé pour mettre les deux cartes à la même référence de potentiel électrique, obligatoire pour lire les données envoyées ou reçues (**Figure 1.22**).

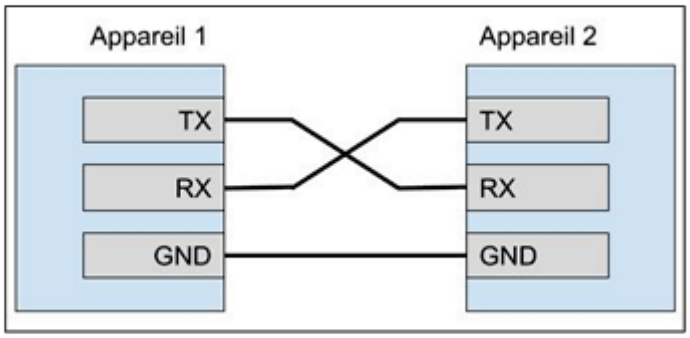


Figure 1.22. *Représentation schématique d'une de liaison de type UART (Universal Asynchronous Receiver-Transmitter) entre deux appareils.*

La communication par liaison UART est réalisée, le plus souvent, en envoyant des informations (phrases, nombres…) codées au format ASCII décimal (*American Standard Code for Information Interchange*). Dans le cas de la carte mère de l'imprimante, la communication avec les appareils

extérieurs est effectuée sous la forme de G-Code modifié par le *firmware* « Marlin ». La majorité des *firmwares* des cartes mères d'imprimantes 3D se basent sur ce codage pour créer leur propre variante, afin d'assurer la communication entre la carte mère et le matériel périphérique.

Ce type de communication est possible si la carte électronique est programmée pour comprendre le codage au format ASCII et, est capable d'interpréter les instructions de G-Code utilisées par le *firmware* de la carte mère. Contrairement à la carte Arduino Mega 2560, la carte mère ne possède qu'une seule liaison série de type UART, liée à deux sorties physiques différentes. L'une est reliée au port USB, utilisé pour la communication avec l'ordinateur et, l'autre aux connexions filaires (RX et TX) liées à la carte électronique Arduino. La carte mère étant incapable d'identifier la provenance des informations reçues, l'utilisation des deux sorties en même temps peut entraîner des erreurs de communication. Pour limiter les erreurs, il est indispensable que la carte mère, la carte électronique et le port USB de l'ordinateur échangent et traitent les informations à la même vitesse. Cette vitesse doit être fixée par la valeur maximale utilisable par la carte Arduino, qui est inférieure à celle des autres équipements (le *baud rate*[8] est limité à 115 000 bits par seconde). De plus, le logiciel Repetier Host n'est pas capable d'initialiser de communication avec la carte mère, lorsque le fil transmetteur (TX) de la carte Arduino est connecté à la liaison série, même si ce fil est inactif. Comme il est impossible de désactiver informatiquement ce fil sans rompre la connexion entre la carte Arduino et la carte mère, il a été nécessaire d'ajouter un relais statique qui permet de couper la connexion entre le fil de transmission et la carte mère. Ce relais statique est contrôlé par une sortie numérique de la carte Arduino et, ne permet la connexion entre le fil de transmission et la carte mère que lorsqu'une information doit être envoyée à la carte mère.

1.3.2.3.2. Communication avec l'écran et le lecteur de carte SD

La communication de la carte électronique avec le lecteur de carte SD et l'écran tactile (**Figure 1.23**) est réalisée par une communication en série par bus SPI (*Serial Peripheral Interface*). Ce type de communication étant plus complet qu'une liaison UART, il nécessite davantage de fils (4). De plus, dans une liaison UART, seuls deux appareils peuvent être reliés en même temps, là où une liaison SPI permet une communication entre plusieurs appareils, en hiérarchisant les priorités. Dans ce dernier cas, un appareil maître va contrôler la communication et, les appareils esclaves vont s'y adapter. Pour une liaison SPI, deux fils permettent l'envoi et la réception de données (MISO : *Master*

[8] Le « Baud Rate » définit la vitesse de transmission dans les liaisons séries et correspond au nombre de bits transmis par seconde.

In Slave Out et MOSI *Master Out Slave In*), de la même façon que pour une liaison UART. Un troisième fil permet au maître d'imposer sa vitesse de communication (son « horloge ») à l'esclave (SCK : *Serial Clock*). Enfin, un quatrième fil permet d'activer ou désactiver l'échange de données avec l'esclave (SS : *Slave Select*). Grâce à ce fil, un même ensemble de connexions (appelé « bus ») permet de lier un appareil maître à plusieurs appareils esclaves. L'ajout d'appareils supplémentaires nécessite seulement l'ajout d'une connexion (SS : *Slave Select*), qui sera activée lors de la transmission d'informations avec cet appareil spécifique (**Figure 1.23**). Grâce à cela, l'écran tactile et le lecteur de carte SD ont pu être connectés au même « bus SPI ».

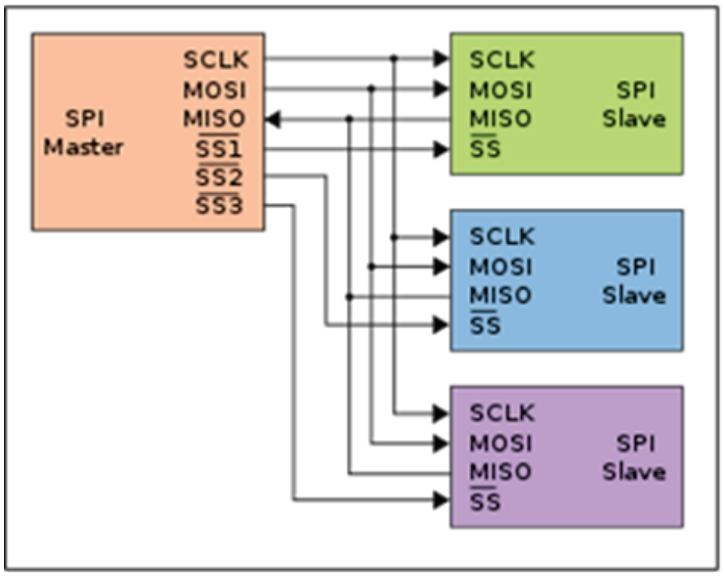


Figure 1.23. *Représentation schématique d'une liaison de type SPI (Serial Peripheral Interface) entre un appareil maître et 3 appareils esclaves.*

1.3.2.3.3. Conception du circuit imprimé

L'ajout d'un circuit imprimé spécialement dessiné (logiciel *Design Spark*) a été nécessaire pour améliorer l'ergonomie générale de la partie électronique de l'imprimante : réduction de l'encombrement, connexions plus fiables avec la carte électronique, interfaçage plus aisé des différents composants. La conception du circuit imprimé a été réalisée en trois temps :

1) Intégration au logiciel de tous les composants électroniques utilisés. Un schéma indiquant l'ensemble de la connectique nécessaire a été réalisé, puis une empreinte physique a été matérialisé sur le circuit imprimé, en tenant compte de sa forme et de ses broches. Le schéma et l'empreinte ont ensuite été liés en un seul composant ;

2) Réalisation d'un schéma de câblage, en liant les connexions de la carte aux différents composants. Cette étape permet d'avoir une vue d'ensemble des connexions et des liens entre les composants ;

3) Une fois le schéma de câblage réalisé, le logiciel transpose les connexions créées aux composants du typon (**Figure 1.24**). Pour finaliser le circuit, l'utilisateur n'a plus qu'à placer les différentes empreintes et tracer les trajets des connexions sans les superposer.

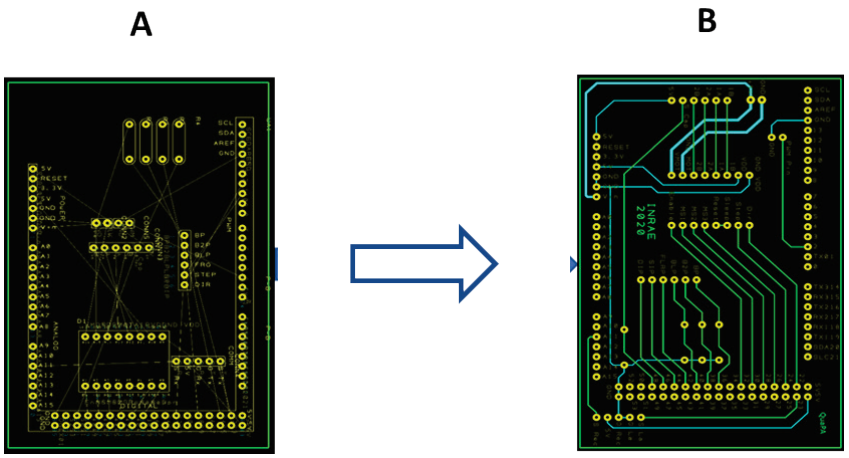


Figure 1.24. *Typon du circuit imprimé. A – Connexion automatique des éléments à partir du schéma de câblage. B – Placement manuel des connexions des éléments.*

Ce circuit imprimé a ensuite été réalisé, par une entreprise extérieure (Util Pocket, Figeac, France), en verre époxy à double face de cuivre. Les différents composants électroniques ont ensuite été soudés dessus, puis le circuit a été connecté à la carte électronique.

1.3.2.3.4. Interface Homme-machine

Lors des modifications apportées à l'imprimante 3D d'origine, le *firmware* de la carte mère a été remplacé par un *firmware* de type « Marlin », car le code source original n'était pas disponible. Cette substitution a également nécessité de remplacer l'écran d'origine de l'imprimante qui n'était pas compatible avec ce *firmware*. Le nouvel écran tactile LCD est compatible avec Arduino®, afin de pouvoir concevoir et utiliser une interface entièrement développée pour le nouveau fonctionnement de l'imprimante. La conception et la réalisation de cette nouvelle interface ont été menées avec le logiciel gratuit Adobe XD. Cette nouvelle interface a été réalisée pour permettre une utilisation simple et intuitive de l'imprimante par l'intermédiaire de menus épurés et d'éléments graphiques (code couleur, barre de remplissage, *etc.*). Quatre menus ont été conçus pour permettre de gérer les

fonctionnalités de l'imprimante 3D.

- ***Menu principal (Figure 1.25a)***

Ce menu présente, dans sa partie haute, l'état général de l'imprimante : 1) l'état d'initialisation de la tête, 2) le niveau de remplissage de la seringue grâce à une barre verticale, et, 3) le fonctionnement du module de refroidissement avec un bouton qui affiche la température du plateau. Dans la partie basse, des boutons permettent à l'utilisateur de réaliser les actions indispensables avant l'impression, comme l'initialisation du doseur volumétrique avec « Init. Preci. » ou l'étalonnage du plateau d'impression avec « Etal. Lit ». Dans le cas d'une utilisation en routine, l'utilisateur n'a normalement pas besoin d'accéder à un autre menu. Une fois le cycle d'impression démarré, les boutons permettant d'accéder aux autres menus ne sont plus affichés et sont remplacés par « pause » et « annuler l'impression ».

- ***Menu de mise à température (Figure 1.25b)***

Ce menu est activé en appuyant sur le bouton d'affichage de la température du plateau du menu principal. Il permet d'afficher la température en temps réel du plateau et de transmettre la consigne de température, dans la limite des températures acceptées (0 à 20 °C). Ce menu permet également de vérifier le fonctionnement du module de refroidissement et de préparer la température du plateau avant l'impression. Il est également possible de modifier la température du plateau en cours d'impression.

- ***Menu de pilotage des déplacements (Figure 1.25c)***

Ce troisième menu, accessible à l'aide du bouton « Mvt. Axes » du menu principal, permet de déplacer la tête d'impression et le plateau de l'imprimante, selon leurs axes respectifs. Il permet un contrôle manuel de l'imprimante, ce qui est utile pour réaliser des tests ou toute activité non prévue dans une utilisation en routine.

- ***Menu de paramétrage de la tête (Figure 1.25d)***

Ce dernier menu, qui est activé en appuyant sur le bouton « Param. Tête », rassemble les éléments liés à la tête d'impression. Les mêmes informations concernant le volume de gel restant sont

présentes, mais il est possible d'extruder ou de rétracter manuellement la vis, le déplacement étant donné en millimètre de gel extrudé. L'utilisateur peut demander le retour de la vis-poussoir en butée minimale. La dernière partie du menu indique la taille de la buse d'extrusion. Comme la taille de cette buse influe directement sur le fonctionnement du moteur du doseur volumétrique, il est nécessaire de pouvoir modifier sa valeur dans le programme, en cas de changement, pour obtenir le débit d'extrusion réel lors de l'impression. Afin de conserver ce paramètre après l'arrêt de l'imprimante, la dernière valeur entrée par l'utilisateur est stockée sur une carte SD et lue lors de l'initialisation de la carte électronique.

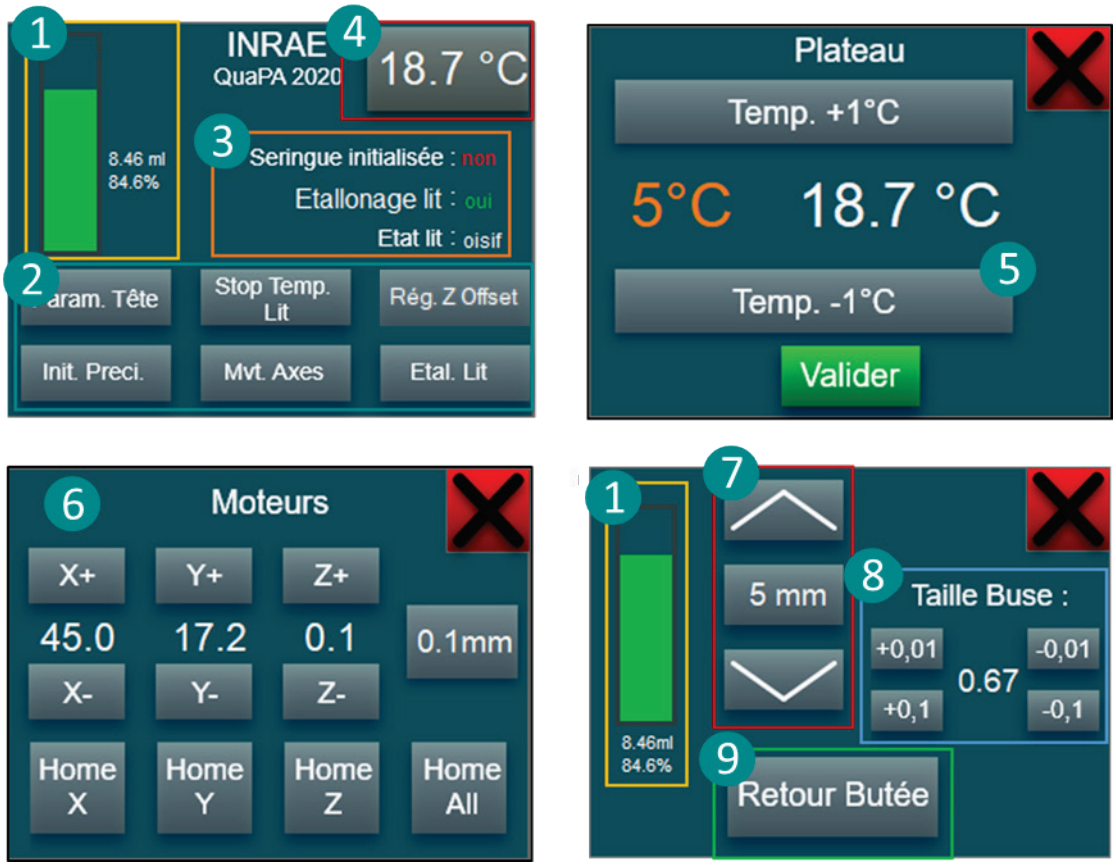


Figure 1.25. *Captures d'écrans des différents menus développés pour le pilotage du second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire. 1) Indicateur de volume d'échantillon dans la seringue ; 2) Choix des menus ; 3) Etat de la tête d'impression et du plateau ; 4) Température du plateau en temps réel ; 5) Choix de la température de consigne du plateau ; 6) Pilotage manuel des moteurs ; 7) Commande d'extrusion manuelle ; 8) Programmation du diamètre de la buse ; 9) Retour en butée du piston du Precifluid®.*

1.3.2.3.5. Pilotage et contrôle du doseur volumétrique

Le système Precifluid® étant un dispositif commercial entièrement autonome, aucun schéma de fonctionnement n'était disponible pour faciliter son intégration dans l'imprimante. Ce fonctionnement

a donc été déduit d'un travail expérimental (**Figure 1.26**).

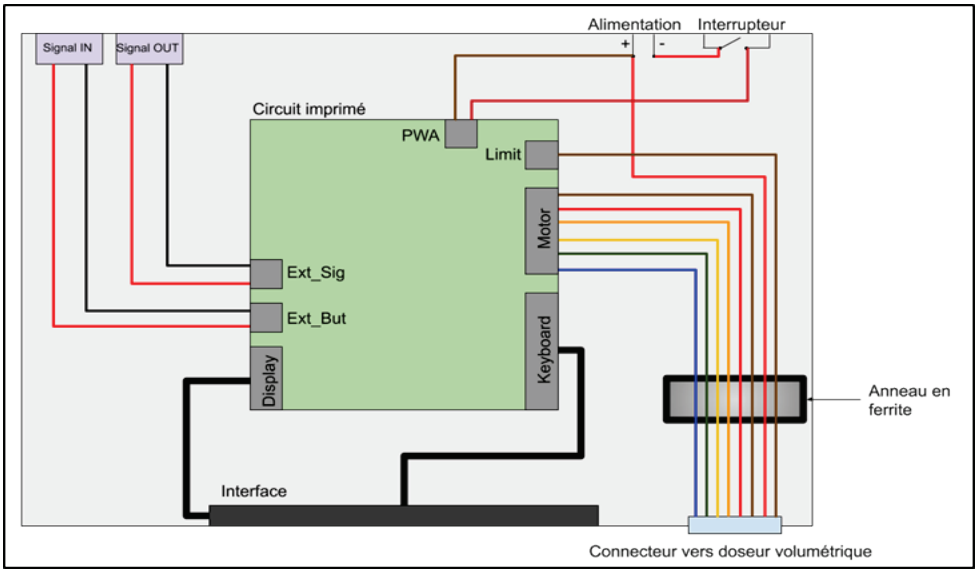


Figure 1.26. *Schématisation du fonctionnement et du câblage du boîtier de contrôle du doseur volumétrique Precifluid®.*

La position de la vis du doseur Precifluid® est donnée par l'électronique de pilotage après une détection de la position « zéro ». Ceci est possible grâce à une butée de fin de course (vis complétement rentrée) qui se présente sous la forme de 2 bornes qui seront reliées électriquement lors de la mise en contact avec la rondelle métallique portée par le bout de la vis (**Figure 1.27**). Le fait de fermer le circuit électriquement fournit une information de position « entrée = zéro » de la vis du Precifluid®, par l'intermédiaire du fil « *limit* ».

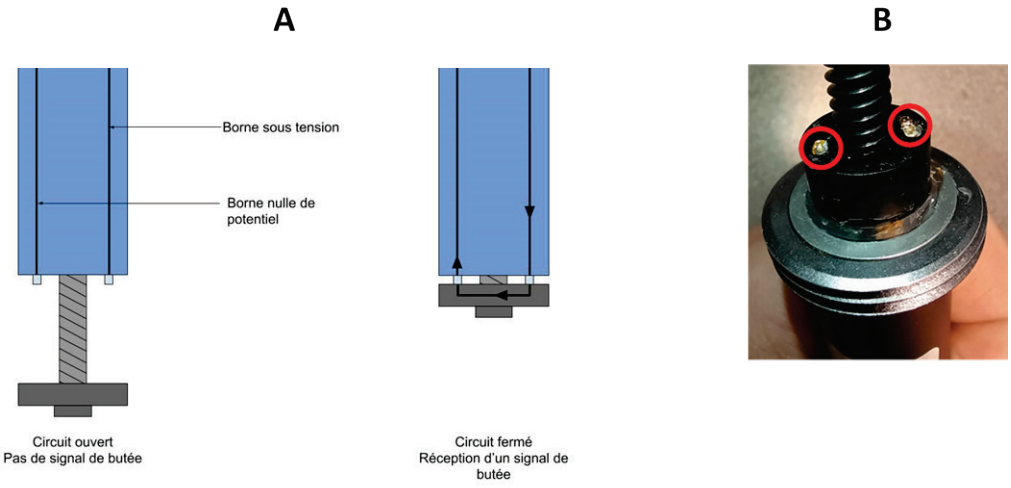


Figure 1.27. *A – Schéma de fonctionnement de la butée et, B – Butées physique du doseur volumétrique Precifluid® (entourée en rouge).*

Pour contrôler le doseur volumétrique, l'utilisation d'un circuit pilote de moteur pas à pas a permis de se passer du boitier de contrôle. Ce type de circuit permet d'interfacer le moteur, dont le contrôle est complexe, avec une carte électronique. Il est alors possible de contrôler le moteur simplement, en indiquant au circuit pilote une direction et en lui transmettant des impulsions (« *step* »), dont le nombre correspond à la valeur de déplacement du moteur. Le circuit pilote traite ces informations et gère les signaux transmis aux bobines du moteur pour réaliser le déplacement. Le circuit pilote fonctionne intégralement avec des entrées et sorties binaires. La **Figure 1.28** présente son câblage.

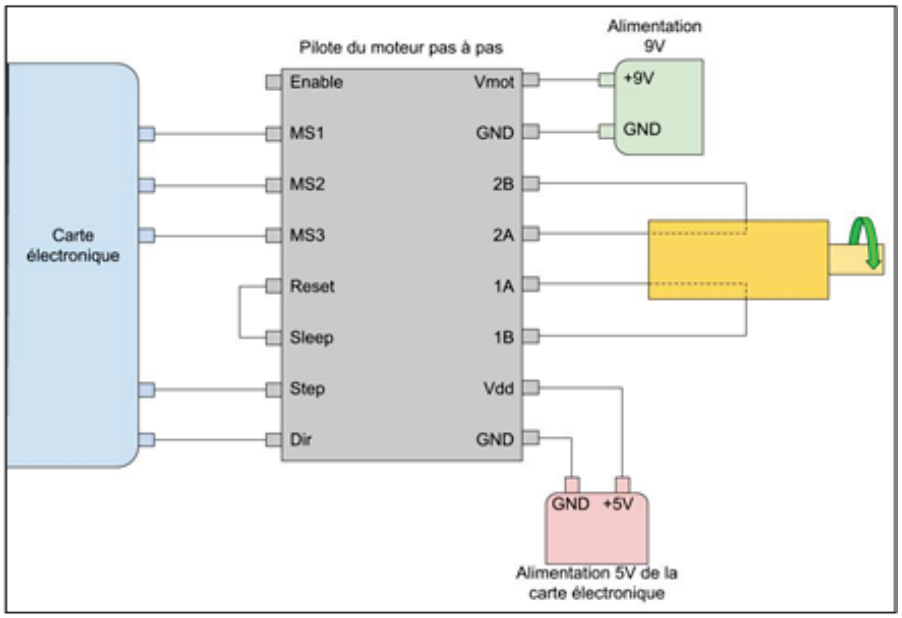


Figure 1.28. *Schéma de câblage du circuit pilote du moteur pas-à-pas mis en place pour contrôler l'action du doseur volumétrique Precifluid®.*

Le contrôle du doseur volumétrique est très proche de celui réalisé par le boitier de contrôle d'origine. La position de la vis-poussoir du doseur n'est réellement connue qu'en butée, sinon elle est calculée. Pour initialiser ce calcul, le programme réalise une mise en butée de la vis qui correspond à une mise à zéro équivalent à un Point d'Origine Machine (POM) d'une machine à commande numérique. La position de la vis sera calculée à tout moment, en prenant en compte le nombre d'impulsions transmises au moteur depuis la mise en butée. Une limite au nombre de « *steps* » réalisable par le moteur a été calculée et vérifiée expérimentalement. Cette limite correspond au moment où la vis arrive en butée contre l'embout de la seringue et, ne peut donc pas avancer davantage. Le programme doit empêcher l'envoi d'impulsions au moteur lorsque cette butée est

atteinte. Avant toute utilisation du doseur volumétrique, il est nécessaire de s'assurer de la bonne initialisation du calcul de positionnement, au risque que la position réelle et la position supposée par la carte électronique ne soient pas les mêmes, ne permettant alors pas au programme de détecter la butée maximale et de bloquer le moteur lorsqu'elle sera atteinte. Lors d'une impression, les informations transmises par la carte mère interrompent le programme de la carte électronique. En effet, elles doivent être vérifiées et transmises au circuit pilote en priorité, le plus rapidement possible, afin de ne pas désynchroniser les mouvements des axes de l'imprimante de ceux du doseur volumétrique.

1.3.3. Validation du second prototype d'imprimante 3D alimentaire

Des modifications importantes ont été apportées au second prototype d'imprimante 3D, tant au niveau mécanique qu'électronique. Il était donc nécessaire de s'assurer que les principaux composants de l'appareil n'étaient pas impactés négativement par ces modifications (par exemple, une dérive du volume déposé en fonction de la température de chauffe de la tête d'impression) et, que ces modifications permettaient d'imprimer des gels qui soient répétables en géométrie et en fermeté.

1.3.3.1. Validation et caractérisation de la régulation thermique

1.3.3.1.1. Effet de la régulation thermique de la tête d'impression sur le débit d'extrusion

Le débit massique est assuré par le servo-contrôle du système de dosage volumétrique Precifluid®. Or, malgré l'ajout d'un joint entre le collier chauffant et le doseur volumétrique (**Figure 1.14**) censé protéger le moteur du Precifluid® des températures élevées, le doseur peut subir des variations de température, par conduction, qui dépendent de la valeur de consigne du collier chauffant (**Figure 1.29**).

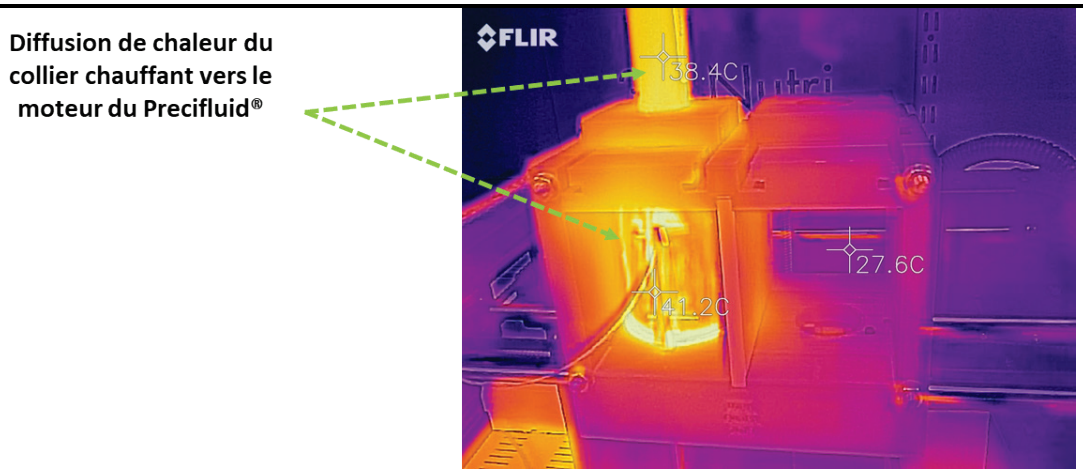


Figure 1.29. *Visualisation, par imagerie infrarouge, du transfert de chaleur qui a lieu entre le collier chauffant et le doseur volumétrique Precifluid®.*

Afin de garantir la précision du débit massique délivré lors de l'impression, un contrôle du débit a été effectué à 3 températures différentes. La masse volumique des gels protéiques étant *a priori* inconnue, les tests ont été réalisés avec de l'eau. Selon le fabricant, le système Precifluid® est insensible aux variations de viscosité grâce à son mouvement électromécanique. Un millilitre d'eau a été extrudé par pas de 0,2 mL à 20, 40, et 60 °C. Chaque série d'extrusion a été répétée 30 fois. Après extrusion, les quantités d'eau délivrées ont été pesées à l'aide d'une balance de précision préalablement contrôlée. La **Figure 1.30** montre les résultats obtenus aux 3 températures testées, mettant en évidence, une sous-estimation du volume comprise entre 0,01 et 0,03 mL, soit entre 1 et 3 % du volume délivré. Ceci a été considéré comme parfaitement acceptable, compte tenu des conditions de fonctionnement de l'extrudeur. A noter que les valeurs du test à 20 °C sont plus faibles et présentent une erreur standard à la moyenne (SEM) plus élevée, sûrement dû à la présence d'une valeur aberrante (écart de 17 % au lieu de 1-3 %) parmi les 30 répétitions induites par une bulle d'air dans l'extrudeur.

Grâce aux modifications apportées à l'imprimante et au pilotage du système Precifluid®, il est désormais possible de régler le débit d'extrusion entre 0,001 et 0,610 $mL.min^{-1}$, dans le cas d'une buse de diamètre 0,69 mm. Un diamètre de buse plus grand permet d'augmenter le débit, si nécessaire.

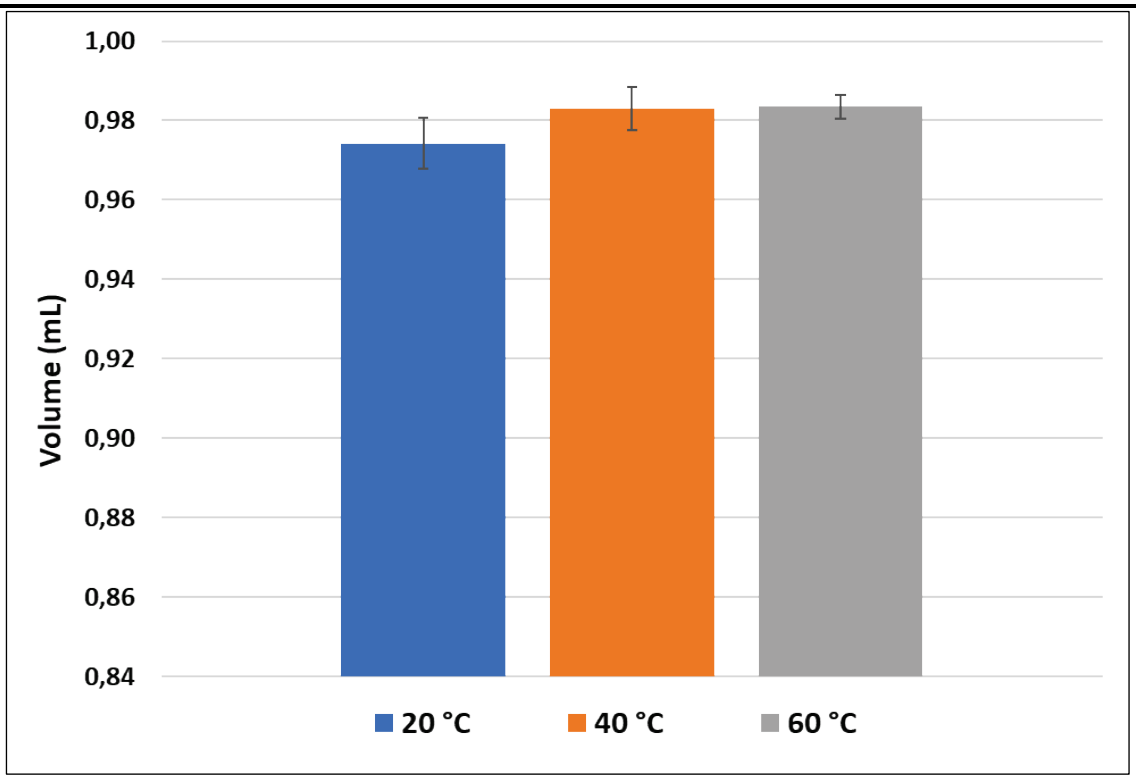


Figure 1.30. *Effet de la température de régulation de l'extrudeur sur le volume d'eau récupéré suite à l'extrusion. Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM.*

La **Figure 1.31** montre l'effet du débit d'extrusion sur la géométrie de l'objet imprimé, sachant que, dans ce cas, notre objectif était d'imprimer un cylindre de gel de gélatine de 20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur. L'analyse visuelle de cette figure permet de se rendre compte que la forme se rapprochant le plus de la géométrie prédéfinie correspond au débit de 0,42 $mL.min^{-1}$. La gélatine est connue pour avoir un comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire que, lorsque la vitesse d'écoulement et le taux de cisaillement augmentent, sa viscosité diminue (Chouarfa, 2021). Ce comportement est visible sur la **Figure 1.31** : en effet, lorsque le débit d'extrusion est inférieur à 0,42 $mL.min^{-1}$, la viscosité de la gélatine est trop élevée pour permettre un écoulement suffisant et la conformité par rapport à la géométrie prédéfinie est médiocre. A l'inverse, pour un débit de 0,70 $mL.min^{-1}$, la viscosité étant plus faible, la gélatine s'écoule plus facilement et la géométrie finale, « semblable à un amas de gouttes d'eau », ne respecte pas non plus la géométrie prédéfinie. Ces résultats permettent de relier les paramètres du procédé à la nature moléculaire de la matrice imprimée. En effet, les matériaux tels que la gélatine ont une structure organisée, constituée de molécules à longue chaîne qui résistent à l'écoulement. Lorsque le taux de cisaillement augmente, les chaînes moléculaires s'alignent parallèlement et ont tendance à glisser les unes sur les autres. La résistance à l'écoulement et la viscosité sont alors plus faibles (Bousquet, 2007).

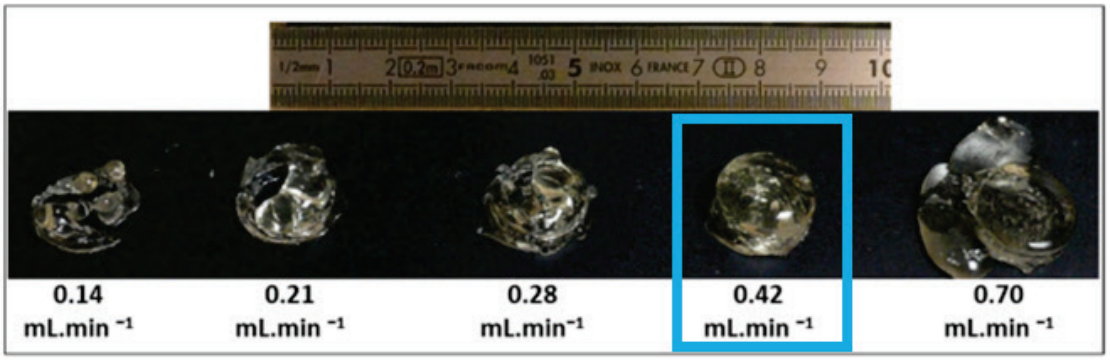


Figure 1.31. *Effet du débit d'extrusion sur la géométrie de gels de gélatine imprimés, sachant que l'objectif était d'obtenir un cylindre de 20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur.*

1.3.3.1.2. Evaluation de la régulation de température du module à effet Peltier

La température de la plaque d'aluminium, correspondant à la face supérieure du module à effet Peltier, a été mesurée pendant 600 s, alors que la consigne avait été fixée à 4 ou 10 °C. La **Figure 1.32a** montre une régulation très satisfaisante pour les trois répétitions de ces enregistrements, effectués à une fréquence de 1 Hz pendant 600 s. Pour une consigne de 4 °C, toutes les mesures sont réparties dans une gamme de 1,00 °C, soit entre 3,60 °C et 4,60 °C. Les moyennes de chaque répétition sont, égales à 4,04 °C ± 0,17 ; 4,05 °C ± 0,14 et à 4,04 °C ± 0,13 °C, respectivement. Pour la consigne à 10 °C, toutes les mesures sont réparties dans une gamme de 0,82 °C, soit entre 9,75 °C et 10,57 °C. Les moyennes de chaque répétition sont identiques et égales à 10,04 °C ± 0,11.

La **Figure 1.32b**, qui rend compte du classement des valeurs de température enregistrées en fonction de leur écart par rapport au point de consigne, révèle que 66 % des valeurs mesurées sont comprises dans l'intervalle 4,0 °C ± 0,1 et 85 % dans l'intervalle 4,0 °C ± 0,2. Pour la consigne à 10 °C, 71 % des valeurs sont comprises dans l'intervalle 10,0 °C ± 0,1 et 88 % dans l'intervalle 10,0 °C ± 0,2.

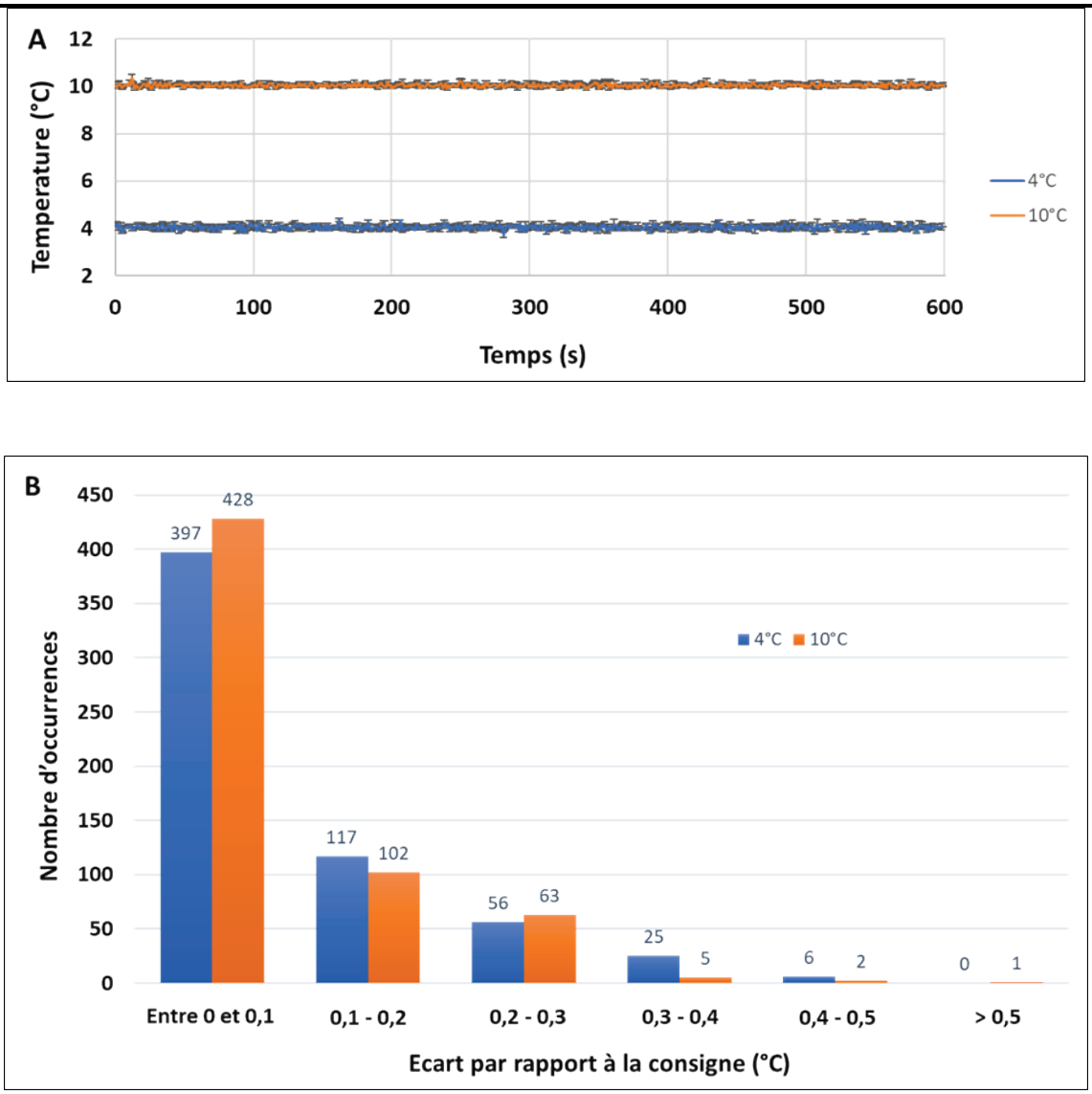
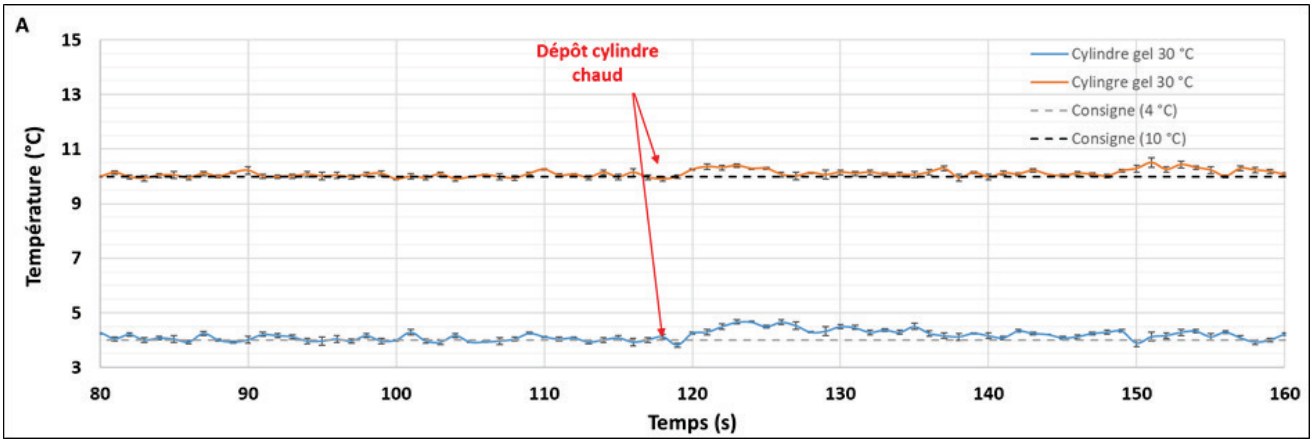


Figure 1.32. *Evaluation de la régulation de la température du module à effet Peltier placé sous le plateau d'impression du second prototype d'imprimante développé au laboratoire : A – Stabilité de la régulation du module à effet Peltier pour une consigne fixée à 4 °C et à 10 °C (les barres d'erreur correspondent à la SEM) ; B – Classement par occurrence de la valeur absolue de la différence entre la température mesurée et la température de consigne.*

Outre la qualité de la régulation de la température du plateau d'impression par rapport à la valeur de consigne désirée, il était aussi nécessaire de caractériser le comportement du plateau d'impression en termes de régulation thermique, lorsque ce dernier est soumis à un dépôt de matière chaude. L'objectif principal est de s'assurer que cette régulation soit suffisamment efficace pour que la couche n soit refroidie suffisamment rapidement pour que la prise en masse permette le dépôt de la couche n+1. La consigne de température a été fixée à 4 °C et la température mesurée par la thermistance a été enregistrée pendant 600 s, soit le temps moyen d'impression des gels protéiques. La compensation de la température par l'algorithme PID a ensuite été évaluée suite au dépôt d'une

masse chaude simulant le dépôt de matière lors de l'extrusion. Pour cela, un cylindre de gélatine de 20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur, préalablement chauffé à 30 °C, a été déposé sur le plateau d'impression, préalablement stabilisé à une température de 4 °C, pendant 120 s. Comme le montre la **Figure 1.33a**, l'augmentation de température due au dépôt du cylindre de gélatine chauffé, qui n'a été que de quelques dixièmes de degré, est du même ordre de grandeur que les variations de température dues à la régulation.

Pour vérifier la stabilité de la régulation à des températures plus élevées, afin de se rapprocher d'une température d'impression correspondant à celle d'un aliment, une plaque d'aluminium de 2 mm d'épaisseur, de surface égale à celle de la plaque d'impression (16 cm^2), et préalablement chauffée à 30, 40 ou 50 °C, a été positionnée sur le plateau après 30 s de stabilisation, à 4 ou 10 °C. L'aluminium a été choisie pour cette expérience, car aux températures testées, les gels protéiques sont à l'état liquide et pourraient donc s'étaler sur la plaque d'impression. Ces conditions sont volontairement défavorables en termes de surface couverte et servent uniquement à vérifier le fonctionnement de la régulation. Les résultats présentés sur la **Figure 1.33b** (exemple d'une une plaque chauffée à 30 °C), montrent une réponse très dynamique de la régulation. En effet, malgré une augmentation significative de la température de la plaque d'impression, comprise entre 1,5 et 2 °C, 10 s après le dépôt de la plaque chaude, la température de consigne est, à nouveau, atteinte après 40 s avec, toutefois, une différence observée de -0,5 °C qui finit par s'estomper au bout de 60 s. A noter que, dans des conditions normales de fonctionnement, une quantité de matériau aussi importante ne peut pas être déposée sur la plaque en une seule fois, car le dépôt par la buse d'impression s'effectue couche par couche, chaque couche ayant une épaisseur de 0,2 mm et une largeur maximale égale au diamètre de la buse utilisée.



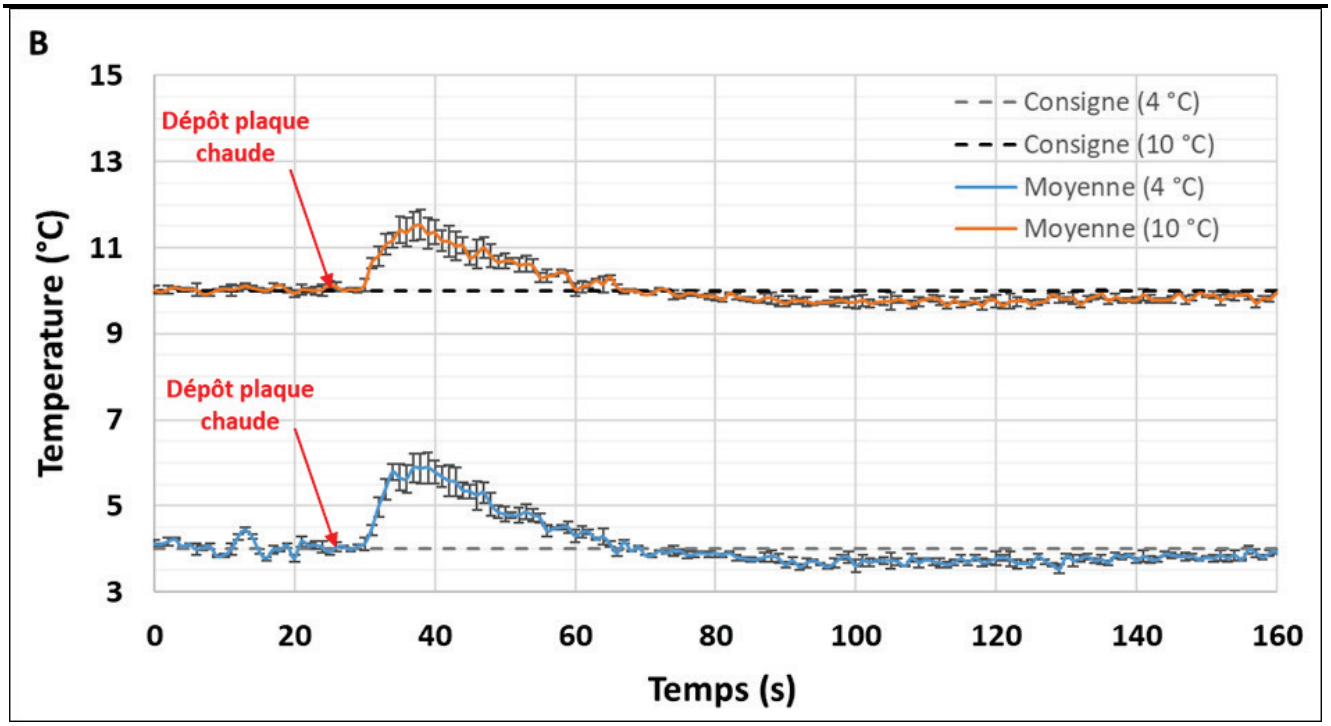


Figure 1.33. *Evaluation de la réponse de la régulation thermique du module à effet Peltier suite au dépôt de matière chaude : A – Dépôt d'un cylindre de gélatine préalablement chauffé à 30 °C ; B – Dépôt d'une plaque d'aluminium de 2 mm d'épaisseur, de surface égale à celle de la plaque d'impression (16 cm²) et préalablement chauffée à 30 °C. Le courbes moyennes sont obtenues à partir de 3 répétitions (barres d'erreur = SEM).*

1.3.3.1.3. Effet du procédé sur la répétabilité de l'impression de gels protéiques

La répétabilité en matière d'impression de gels de gélatine a été évaluée par une mesure de la fermeté de ces gels. Pour cela, cinq cylindres de gels de gélatine ont été imprimés à un débit de 0,42 mL.min^{-1}. La gélatine utilisée (type A et indice Bloom 200 ; 13,78 % d'humidité) provenait de peau de porc (Caldic Ingredients, Rognac, France). La teneur en eau du gel a été fixée à 3 kg_{eau}/kg_{MS} (soit pour un volume d'environ 20 mL, 5 g de gélatine en poudre et 16,56 g d'eau ultra-pure). Le mélange a été placé à 50 °C, sous agitation, jusqu'à dissolution complète. Le gel a ensuite été versé dans la seringue du système de dosage Precifluid® et maintenu à 50 °C par le collier chauffant jusqu'à l'extrusion. Les gels ont été imprimés en 3D sous la forme de cylindres de 20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur, à partir d'un fichier au format « stl » converti en G-Code via le logiciel *Repetier-Host* contenant le trancheur *CuraEngine*.

La texture du produit imprimé étant une propriété fondamentale pour le futur aliment, il était nécessaire de s'assurer de la répétabilité de l'impression en termes d'homogénéité des couches déposées et du remplissage interne. Pour cela, des mesures mécaniques ont été effectuées à l'aide d'un texturomètre (EZ-Test LX, Shimadzu, Noisiel, France). Selon Schreuders, Schlangen,

Kyriakopoulou, Boom & van der Goot (2021), les techniques instrumentales fournissent des informations objectives sur différentes variables structurelles et peuvent donc être utilisées pour caractériser la structure des produits carnés. La méthode choisie pour cette étude a été l'analyse du profil de texture (TPA), réalisée avec les conditions suivantes : un diamètre d'échantillon de 20 mm, un diamètre de sonde de compression de 50 mm, une détection de surface fixée à 0,5 N, une vitesse de déplacement de 20 $mm.min^{-1}$ et une double compression à 50 % de la hauteur de l'échantillon. Seules les valeurs de fermeté correspondant à la force maximale mesurée à chaque compression ont été exploitées. Avant les mesures, les échantillons de gel étaient conditionnés à 4 °C pendant 12 h de façon à obtenir une gélification optimale, puis placés à température ambiante 2 h avant la mesure.

La **Figure 1.34** montre les courbes de double compression obtenues pour les cinq gels testés. Pour faciliter la visualisation, chaque courbe a été décalée de la précédente de 3 s le long de l'axe des abscisses. Les moyennes (± SEM) des valeurs maximales de chaque pic ont été calculées et sont indiquées sur le graphique sous forme de lignes horizontales. Cette figure révèle une bonne répétabilité des mesures, avec 4 répétitions sur 5 se situant à ± 1 SEM et toutes les répétitions se situant à ± 2 SEM.

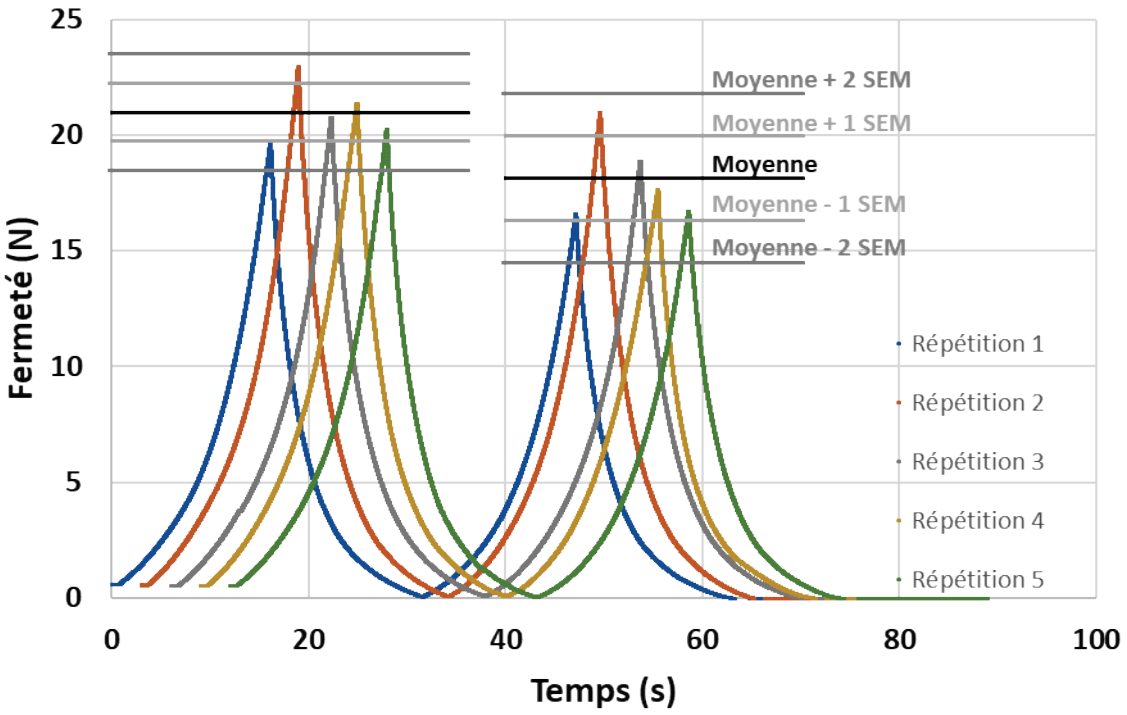


Figure 1.34. *Evaluation de la fermeté de 5 gels de gélatine imprimés, à l'aide du test de Texture Profile Analysis (TPA). La ligne horizontale (en noir) représente la moyenne des forces maximales pour les 5 échantillons et, pour les deux compressions successives. Les SEM sont représentés par les lignes horizontales gris clair et gris foncé.*

1.3.3.1.4. Effet du gradient thermique lié au plateau d'impression sur l'impression de gels protéiques

Afin d'évaluer l'importance de la régulation froide du plateau d'impression sur la qualité des gels protéiques imprimés, des essais ont été réalisés à 10 et 24 °C (température ambiante). La température de 10 °C a été déterminée expérimentalement lors de tests préliminaires et identifiée comme la mieux adaptée à l'impression de ce type de gel. En effet, en dessous de cette température, les gels se solidifient trop rapidement et le dépôt des couches se fait de manière irrégulière. Au-dessus de cette valeur, la gélification est insuffisante et le gel s'écoule sans se conformer à la géométrie programmée. La **Figure 1.35** montre l'effet de la température du plateau d'impression sur la forme finale de l'objet imprimé. À 10 °C, la forme était plus régulière, tandis qu'à 24 °C, la forme imprimée n'était cylindrique qu'à sa base et formait ensuite un dôme. A noter que les objets imprimés avaient délibérément une hauteur de 5 mm pour éviter l'effet du gradient thermique.

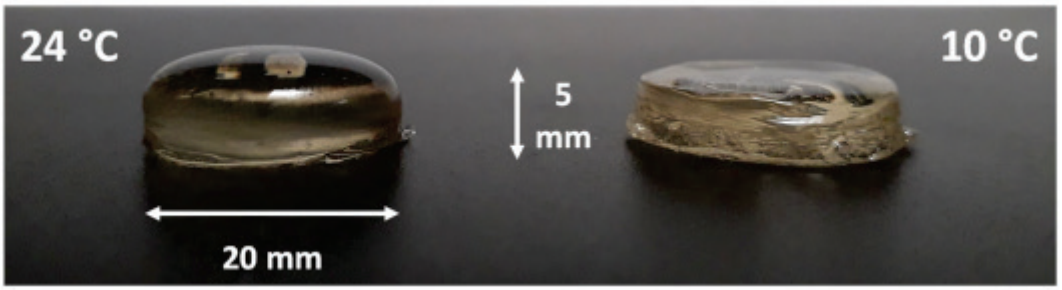


Figure 1.35. *Effet de la température du plateau d'impression (10 et 24 °C) sur la géométrie de cylindres de gel de gélatine de 20 mm de diamètre et de 5 mm de hauteur.*

Les différents essais ont révélé une hétérogénéité dans la géométrie des gels imprimés sur l'axe z. Ceci a été initialement attribué à un problème de paramétrage lors de l'I3D, notamment en lien avec le débit d'extrusion. Cependant, des observations au stéréo-microscope (**Figure 1.36a**) ont révélé un lien probable entre la forme de l'objet et la présence d'un gradient de température au sein même de celui-ci. La **Figure 1.36a** montre une régularité des couches déposées jusqu'à une hauteur d'environ 4 mm. A partir de 4 mm, une courbure est observée, déformant la partie supérieure de l'objet (dôme visible sur la **Figure 1.35**). Ce phénomène peut être attribué à un défaut de refroidissement qui entraîne l'apparition d'un gradient de température au sein des couches de gels. Au-delà de 4 mm, la couche n est trop chaude pour permettre un dépôt satisfaisant de la couche n+1. Ce problème avait été envisagé lors de la conception du dispositif, sans qu'il soit alors possible de prévoir la hauteur du

gradient thermique. Ce constat justifie d'ailleurs la mise en place d'un second système de contrôle de la température pour compenser l'élévation de température au sein de l'échantillon, qui joue le rôle d'isolant thermique par rapport à la surface d'impression. Au passage, la **Figure 1.36b** montre que l'épaisseur des couches déposées est parfaitement conforme à la valeur demandée dans le trancheur (200 µm). En effet, l'épaisseur de 3 couches mesurée avec un stéréo-microscope était égale à 603,93 µm, soit 201,31 µm, en moyenne, par couche.

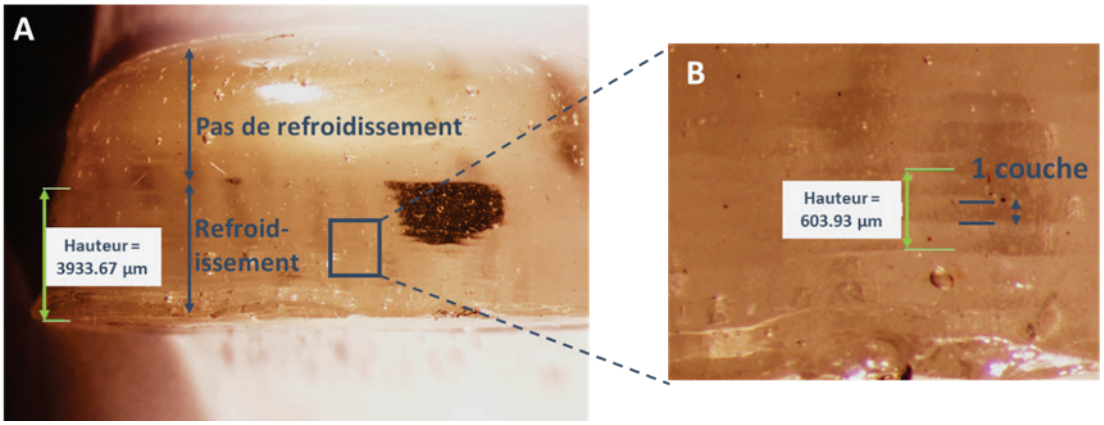


Figure 1.36. *Visualisation de l'effet du gradient thermique lié au plateau d'impression sur la géométrie des gels de gélatine imprimés : A – Déformation de la structure en partie haute du gel dû à un défaut de refroidissement ; B – Contrôle de l'épaisseur des couches déposées. La géométrie des gels imprimés en 3D a été vérifiée à l'aide d'un stéréo-microscope (**Tableau 1.1**) équipé d'une caméra numérique couleur de 5,9 M pixels.*

La répétabilité de l'impression des gels a pu également être vérifiée au moyen de pesées. Pour les 5 échantillons imprimés dans les mêmes conditions, la masse moyenne était de 1,944 g ± 0,035, soit une variation de ± 1,79% de la masse totale de l'échantillon. Cette mesure nous renseigne sur le fait que le taux de remplissage est constant d'un échantillon à l'autre et confirme que la purge programmée avant l'étape d'impression est efficace et nécessaire pour limiter le nombre de bulles d'air potentielles.

1.3.4. Amélioration du système de refroidissement en cours d'impression

Comme indiqué précédemment (*cf.* 1.3.3.1.4), le refroidissement provenant du plateau d'impression ne suffit pas à assurer une géométrie correcte du gel imprimé, au-delà de 4 mm de hauteur. Un second dispositif de refroidissement, complémentaire au plateau, consistant à diriger un jet d'air comprimé, à température ambiante, en direction du gel en cours d'impression, a donc été développé. Un détendeur a dû être installé en amont du dispositif pour réguler la pression d'entrée,

fixée entre 0,2 et 0,4 MPa. Ce dispositif a été fabriqué par I3D polymère, son principe est détaillé sur la **Figure 1.37**.

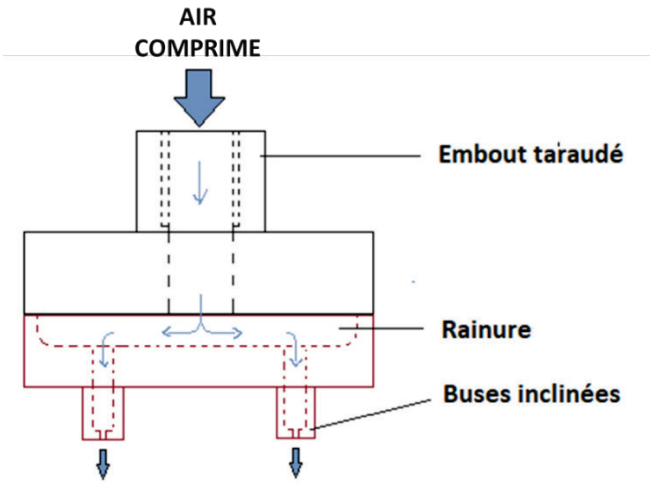


Figure 1.37. *Schéma de principe du système de refroidissement additionnel par air comprimé, installé pour permettre au produit imprimé de conserver sa forme, au fur et à mesure de l'impression.*

Ce dispositif a été intégré à la tête d'impression de l'imprimante, de façon que ses mouvements soient coordonnés avec ceux de la buse d'extrusion (**Figure 1.38**). Pour s'adapter aux différentes géométries imprimables, les buses intégrées au dispositif sont orientables.

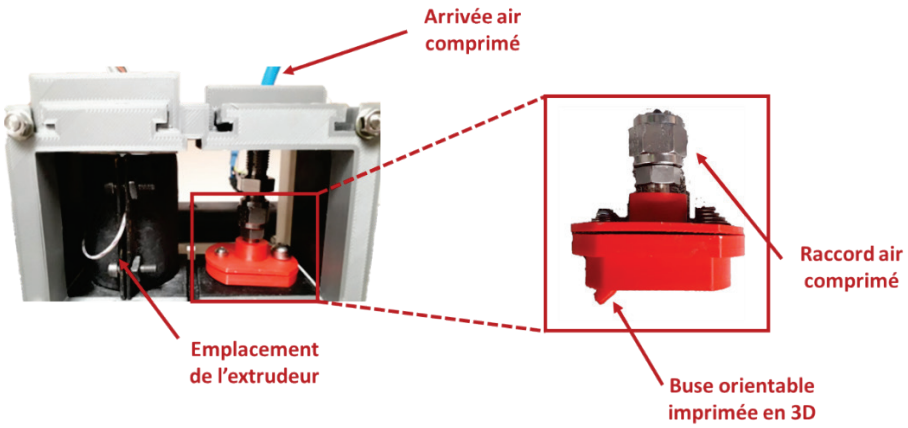


Figure 1.38. *Intégration du dispositif de refroidissement additionnel par air comprimé à la tête d'impression du second prototype d'imprimante 3D alimentaire développé au laboratoire.*

Comme visible sur la **Figure 1.39**, combiner le jet d'air comprimé avec le plateau refroidissant a un impact positif sur la géométrie des gels de gélatine, avec des surfaces plus planes et des angles plus vifs. Cependant, le fait d'utiliser de l'air comprimé entraîne une modification de l'aspect des gels, qui

deviennent plus rugueux et plus opaques, ce qui peut être dû à l'incorporation de bulles d'air.

Figure 1.39. *Images des gels de gélatine imprimés et refroidis : A – seulement, par le plateau d'impression ; et B - en associant avec un jet d'air comprimé à 0,4 MPa.*

Afin de vérifier un éventuel impact du jet d'air sur la texture des gels de gélatine, des mesures de fermeté ont été réalisées au texturomètre, dans les conditions suivantes : vitesse de 20 $mm.min^{-1}$; sonde de diamètre 50 mm ; échantillon de diamètre 20 mm et de hauteur 7 mm. Pour ces analyses, trois nouveaux lots de 3 échantillons ont été imprimés, selon les conditions suivantes : aucun refroidissement par jet d'air (lot 1) ; utilisation d'un jet d'air à 0,2 MPa (lot 2) ; et utilisation d'un jet d'air à 0,4 MPa (lot 3). Les résultats (non présentés ici) indiquent que les masses des échantillons ne sont pas significativement différentes entre les 3 lots, même si les échantillons du lot 1, non refroidis par jet d'air, présentaient une fermeté moyenne supérieure (64,8 N ± 3,6) à celle des échantillons du lot 3 (55,3 N ± 4,2), refroidis au moyen d'un jet d'air à 0,4 MPa. Cette tendance observée peut s'expliquer par le fait qu'une pression de 0,4 MPa doit provoquer l'incorporation de bulles d'air dans le gel, modifiant ainsi l'aspect visuel, mais aussi sa texture.

L'utilisation d'un système de refroidissement associant le plateau d'impression et un jet d'air comprimé additionnel est donc envisageable pour permettre d'imprimer des gels de gélatine texturés de hauteur supérieure à 4 mm.

1.3.5. Faisabilité d'un système de post-traitement in situ par convection à air chaud

Le post-traitement par air chaud n'est pas destiné à être appliqué à des gels de gélatine, qui ne supporteraient évidemment pas une élévation brutale de la température, mais à étendre le fonctionnement de l'imprimante en vue d'une application à d'autres aliments carnés.

Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 0**, la question du post-traitement *in situ* d'aliments

imprimés n'est pas encore tranchée. Le fait de cuire un aliment directement dans l'imprimante pose de nombreux problèmes techniques, surtout si cette cuisson se fait conjointement à l'impression et, non en fin de procédé. Bien que plus compliquée à mettre en œuvre, la cuisson couche par couche permettrait pourtant d'atteindre une température à cœur de l'aliment optimale, sans devoir surchauffer les faces externes. Pour qu'un système de post-traitement soit considéré comme utilisable et efficace, il doit permettre : (1) de détruire les germes pathogènes potentiellement présents ; (2) de fortement limiter, voire inhiber, la formation de composés néoformés, tels que les amines aromatiques hétérocycliques qui apparaissent dès 150 °C (Kondjoyan et al., 2010) ; (3) de préserver les qualités nutritionnelles, notamment les vitamines présentes (Kondjoyan, Portanguen, Duchène, Mirade & Gandemer, 2018) et, (4) de conserver une texture adaptée aux capacités masticatoires des différentes populations cibles, comme, par exemple, les personnes âgées.

Comme mentionné dans le **Chapitre 0**, plusieurs modes de cuisson ont été étudiés dans la littérature. La cuisson radiative par laser semble la plus prometteuse et la plus adaptée aux dimensions d'un aliment imprimé. Cependant, son application est complexe, notamment en termes de pilotage par rapport à l'imprimante. Cette solution est néanmoins en cours de développement, en parallèle de la fin de ce travail de thèse (résultats non présentés). Pour l'heure, une approche plus simple, par convection à air chaud, a été conçue, afin d'en évaluer la pertinence. Un tel système nécessite de produire de l'air chaud. Cela peut être fait soit au moyen d'un générateur externe à l'imprimante, ce qui implique ensuite d'amener le fluide chaud au niveau de l'aliment, fluide qui aura tendance inévitablement à se refroidir, soit au moyen d'un système *ad hoc* placé au plus près de la tête d'impression. C'est cette seconde solution qui a été choisie et qui s'est traduite par la conception d'un échangeur de chaleur en cuivre destiné à être directement intégré à proximité de la tête d'impression de l'imprimante. Les échanges thermiques au sein du dispositif vont dépendre de la puissance des résistances, des dimensions du tube et du type d'écoulement (vitesse et turbulence du flux d'air et différence de pression entre l'entrée et la sortie).

Cet échangeur a été conçu en une seule pièce et a été imprimé en cuivre avec l'imprimante 3D de DeskTop Metal™. Il se présente sous la forme d'un bloc contenant :

- Une entrée et une sortie d'air taraudées (pas métrique M6) ;
- Un conduit en forme de spirale, relié aux entrée/sortie, de 3,9 m de long, permettant l'échange thermique entre le bloc en cuivre chaud et l'air tout au long du conduit ;

4 emplacements pour placer des résistances chauffantes de 150 W (Cartridge heater, RS Components, France).

La **Figure 1.40** présente une vue générale du dispositif.

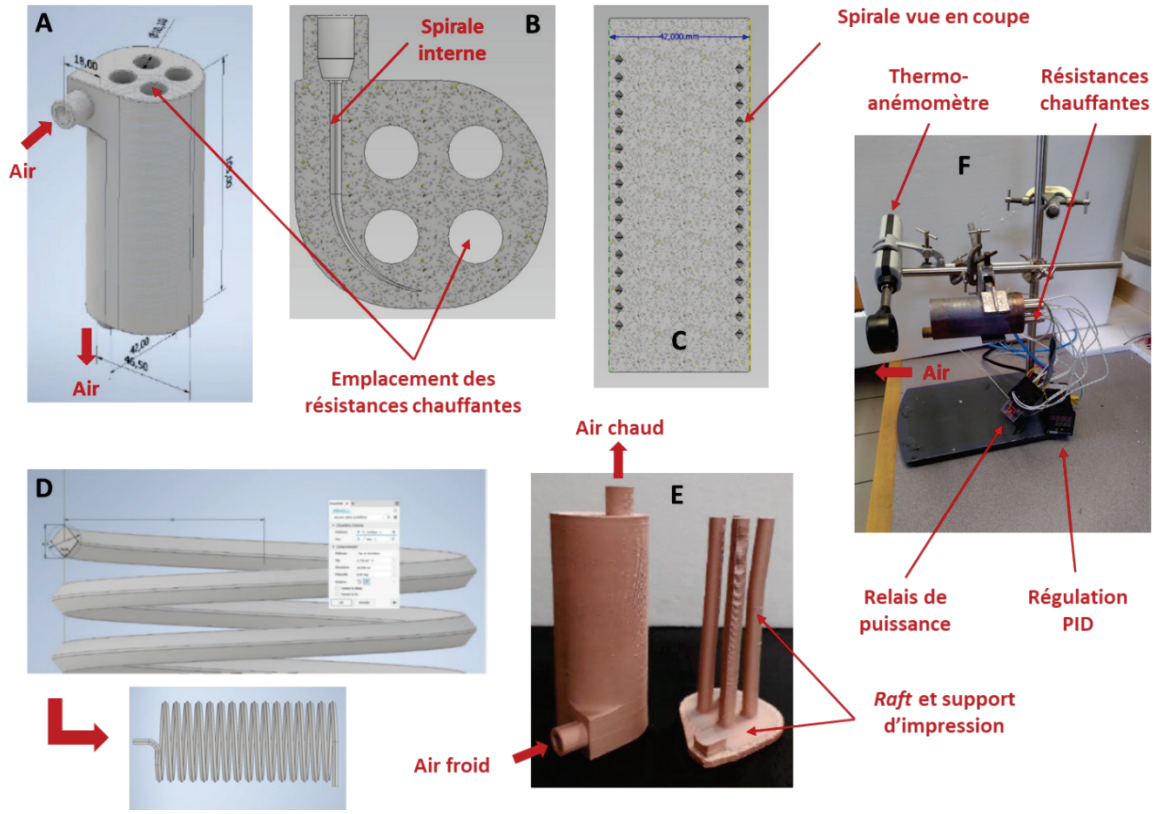


Figure 1.40. *Vues détaillées de l'échangeur thermique conçu pour chauffer l'air en vue de procéder à une cuisson de l'aliment en cours d'impression : A – Vue générale de la modélisation CAO ; B – Vue selon une coupe transversale de l'échangeur ; C – Vue selon une coupe longitudinale de l'échangeur : D – Vue modélisée de la spirale interne dans laquelle l'air circule ; E – Vue extérieure du système en cuivre après impression ; F – Installation du dispositif pour la mesure des températures et des vitesses d'air (isolant retiré pour la prise de la photographie).*

La conception de l'échangeur a dû tenir compte des contraintes liées à l'impression des métaux (épaisseur minimale de paroi de 1 mm et diamètre interne de l'ordre de 2-3 mm), mais aussi et surtout, au fait qu'il ne devait pas y avoir de supports de fabrication dans la spirale, car il était impossible de les retirer par la suite. Cette spirale a donc été conçue avec une section en forme de losange (**Figure 1.40d** et **Figure 1.41a**), de façon à avoir une structure autoportante. L'impression s'est faite verticalement et les seuls supports nécessaires ont été ceux destinés aux perçages pour les résistances chauffantes (**Figure 1.40be**). Le principe de l'I3D est de dessiner un motif de remplissage interne afin d'alléger les pièces. Ce motif va, néanmoins, limiter les transferts thermiques par la présence d'air. Dans le cas de notre échangeur, il a donc fallu augmenter les épaisseurs de paroi au niveau des perçages au contact des résistances chauffantes pour favoriser ces transferts (**Figure 1.41b**).

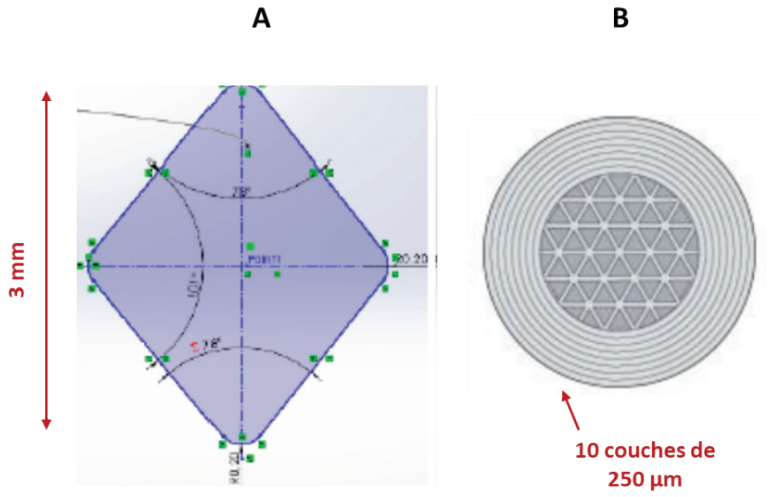


Figure 1.41. *A – Modélisation de la section autoportante de la spirale interne de l'échangeur. B – Motif de remplissage interne et épaisseur de paroi du bloc de cuivre.*

Le dispositif de chauffage a été alimenté par le réseau d'air comprimé à 0,8 MPa ; un détendeur a été placé en amont de l'échangeur afin de réguler la pression. En effet, une pression trop élevée peut conduire à un décollement des couches imprimées. La température de l'échangeur a été régulée par un algorithme de type PID (résistances chauffantes) et, la température de l'air en sortie de l'échangeur est directement liée à la pression d'air comprimé à l'entrée, comme le montre le **Tableau 1.3**.

Tableau 1.3. *Effet de la pression d'air et de la température de régulation des résistances chauffantes sur la température d'air à 30 mm de la sortie de l'échangeur. Les valeurs des températures et des vitesses indiquées correspondent à des valeurs moyennes obtenues après une stabilisation de 600 s.*

	P=0,04 Mpa		P=0,10 Mpa		P=0,16 Mpa		P=0,20 Mpa	
T° régulation (°C)	T° air (°C)	V ($m.s^{-1}$)	T° air (°C)	V ($m.s^{-1}$)	T° air (°C)	V ($m.s^{-1}$)	T° air (°C)	V ($m.s^{-1}$)
80	34,0	1,64	35,8	3,48	35,8	4,53	34,7	5,45
100	38,2	1,97	39,5	3,42	39,5	4,56	38,4	5,40
120	41,7	1,64	43,5	3,27	43,8	4,94	42,5	5,25
140	45,4	1,44	46,9	3,07	47,2	4,96	46,2	4,60
200	55,0	1,33	54,5	2,84	54,6	3,96	53,2	4,83

Ce tableau indique que, même pour une température de régulation de 200 °C, la température d'air est relativement faible à 30 mm de la sortie de l'échangeur, quelle que soit la pression d'entrée ; le rendement énergétique est donc médiocre. Néanmoins, ces températures pourraient être

compatibles avec une cuisson « basse température », mais pour des pas de temps difficilement compatibles avec un procédé d'I3D, mais surtout, trop faibles pour se prémunir du risque microbiologique. De plus, la température la plus élevée (55 °C) a été obtenue avec un niveau de pression bas, qui ne permet pas une focalisation efficace du flux d'air. En effet, la buse doit être placée très proche de l'aliment (< 30 mm) et un risque de surcuisson est alors possible sur les faces externe et interne des couches inférieures. Un autre élément rend l'intégration de l'échangeur délicate au niveau de la tête d'impression : sa masse de 1,1 kg qui a tendance à déstabiliser les rails de guidage de la tête et à provoquer une inertie dans les mouvements lors des phases d'arrêt ou de changement de direction. Pour toutes ces raisons, il semble difficile de retenir la solution du chauffage par convection à air chaud comme méthode de post-traitement efficace *in situ* des aliments imprimés. La cuisson radiative par laser, actuellement développée et en phase de test au laboratoire, est prometteuse et conduira probablement à une solution robuste, parfaitement intégrable à la tête d'impression de l'imprimante.

SYNTHESE DU CHAPITRE 1

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis :

- De développer un prototype d'imprimante 3D alimentaire capable d'imprimer des gels protéiques d'origine animale ;
- De développer des dispositifs de refroidissement pour faciliter la gélification des matrices utilisées et conduire à des aliments de hauteur suffisante ;
- D'évaluer le potentiel de moyens de post-traitement ;
- De valider le prototype développé, en termes de fiabilité du paramétrage et de répétabilité de l'impression ;
- Et enfin, d'améliorer la structuration de gels protéiques sans avoir besoin de recourir à des additifs texturants (**Figure 1.42**).

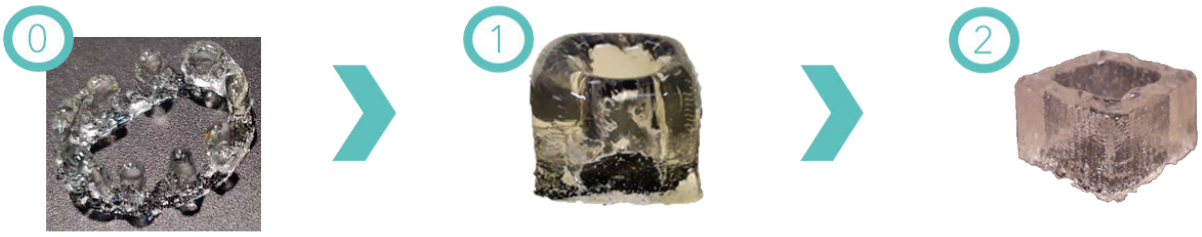


Figure 1.42. *Evolution de la qualité d'impression de gels de gélatine en fonction des développements techniques améliorant la phase de refroidissement lors de l'impression : 0 – sans refroidissement ; 1 – refroidissement uniquement par le plateau d'impression ; 2 – couplage du refroidissement par le plateau et par le jet d'air comprimé.*

La texturation de matrices protéiques est possible en maîtrisant les paramètres mécaniques. Toutefois, pour certaines formulations complexes, un couplage de la texturation mécanique avec les propriétés intrinsèques des produits peut s'avérer nécessaire. Le **Chapitre 2** va s'attacher à évaluer la faisabilité d'assurer un complément de texturation par l'ajout d'un ingrédient dans une matrice protéique : la réaction de glycation.

Chapitre 2 :

La glycation, une alternative pour la texturation d'aliments fonctionnels ?

-

Etude des mécanismes sur un milieu modèle à base de gélatine

Un des objectifs de cette thèse est d'évaluer les avantages et les inconvénients du couplage de deux approches dans la texturation d'un aliment carné destiné à des personnes souffrant d'une déficience masticatoire : la réaction de glycation et l'I3D alimentaire. Cette association constituant un concept nouveau que nous avons appelé Glyc3D (**Figure 2.1**).

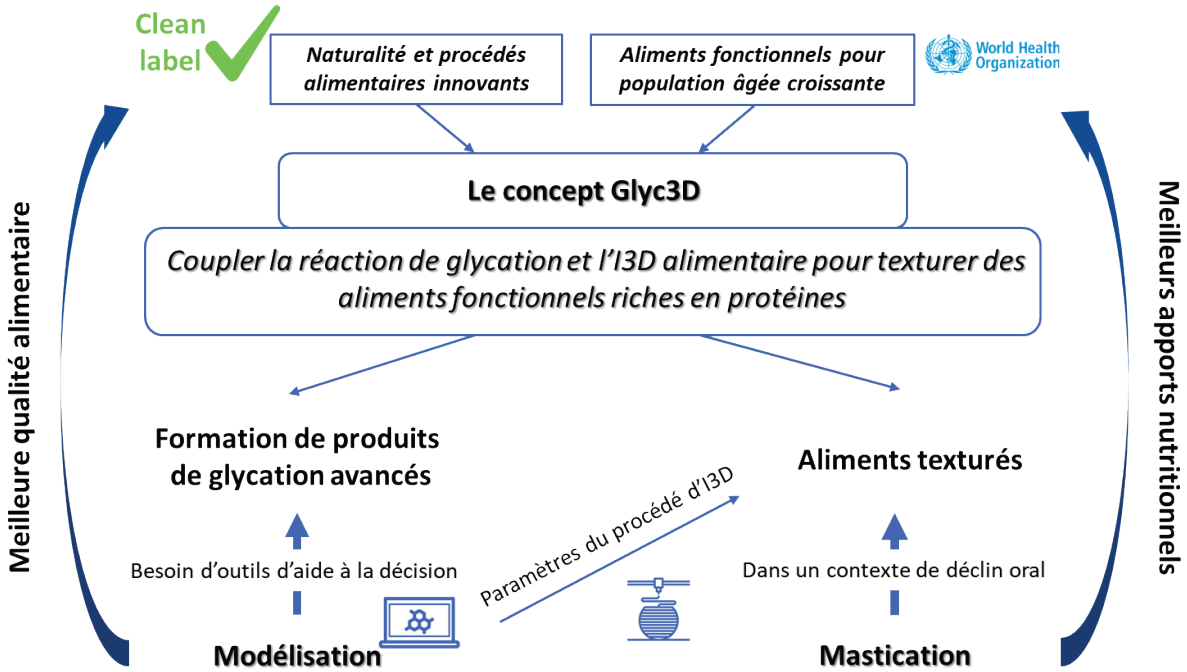


Figure 2.1. *Concept « Glyc 3D » : couplage entre la réaction de glycation et l'I3D alimentaire pour la texturation d'un aliment carné imprimé.*

La réaction de glycation permet d'améliorer les propriétés fonctionnelles des aliments (Nooshkam et al., 2020 ; Wang et al., 2022). Un milieu modèle à base de protéines animales, *i.e.* la gélatine, a été choisi pour déterminer les conditions réactionnelles optimales de la glycation et, pour en évaluer les effets sur la texture des aliments. Bien qu'encourageants en matière de texturation des gels de gélatine, les premiers résultats obtenus ont aussi mis en évidence une variabilité de la matière première, rendant délicate la transposition des conditions opératoires entre des lots de gélatine différents. Ce chapitre est construit à partir d'expériences préliminaires qui ont permis de poser les bases de la glycation dans un gel de gélatine, ainsi que sur trois articles, qui concernent la réaction de glycation en tant que méthode de texturation complémentaire pour des aliments imprimés en 3D.

Un article de synthèse[9] a permis de réaliser un état de l'art concernant l'utilisation de la réaction de glycation dans les aliments, puis deux articles[10,11] de recherche ont apporté des éléments de compréhension quant aux mécanismes impliqués, lors de la glycation, au sein de gels de gélatine.

2.1. Etat de l'art sur la réaction de glycation

2.1.1. Les mécanismes et paramètres de la réaction de glycation

La glycation peut avoir lieu *in vivo* ou *in vitro*. Contrairement à la glycosylation, la glycation est une réaction non enzymatique qui forme des liaisons covalentes entre les groupes carbonyles (aldéhyde ou cétone) des oses simples et les groupes amines ou hydroxyles des acides aminés des protéines. La **Figure 2.2** présente la réaction de glycation de manière simplifiée, tandis que les **Figure 2.3** et **Figure 2.4** montent les mécanismes réactionnels de façon plus détaillée (Martinez-Alvarenga et al., 2014 ; Sun et al., 2021). Lorsque la glycation se produit sur un groupe aminé d'un acide aminé, on parle de *N*-glycation, et lorsqu'elle se produit sur un groupe hydroxyle, on parle de *O*-glycation (Sun et al., 2021). En théorie, tous les glucides réducteurs sont réactifs à la glycation, mais le degré de réactivité dépend principalement de trois facteurs : 1) l'équilibre entre les formes cycliques et acycliques, 2) la taille moléculaire du glucide, et 3) l'état de charge négative. Une augmentation des deux derniers facteurs réduit l'ampleur de la glycation. C'est pourquoi un pentose tel que le ribose est plus réactif qu'un hexose tel que le fructose, qui à son tour est plus réactif qu'un autre hexose tel que le glucose (Taghavi, Habibi-Rezaei, Amani, Saboury & Moosavi-Movahedi, 2017). La *N*-glycation est la plus référencée dans la littérature, elle se décompose en plusieurs étapes. Comme le montre la **Figure 2.2**, l'étape initiale conduisant à la formation d'une base de Schiff est réversible, mais après la formation d'une liaison cétoamine, lors de l'étape de réarrangement d'Amadori, la réaction devient irréversible.

[9] Portanguen, S., Meurillon, M., Duconseille, A., Drancourt, N., Peyron, M.A., Sicard, J., Dumoulin, C., Théron, L., Tournayre, P., Astruc, T. & Mirade, P.-S. Using the glycation reaction to texturize 3D printed foods for people with oral declines: a review. (En cours de révision dans la revue *Food Research International*).

[10] Portanguen, S., Dumoulin, C, Duconseille, A., Meurillon, M., Sicard, J., Théron, L., Chambon, C., Sayd, T., Mirade, P.S. & Astruc, T. Impact of water content and Bloom index on gelatin glycation. *Food Hydrocolloids*, *145*, 109096. DOI : 10.1016/j.foodhyd.2023.109096 (*cf.* **Annexe V 7**).

[11] Portanguen, S., Dumoulin, C., Duconseille, A., Meurillon, M., Mirade, P.S. & Astruc, T. Effects of the glycation reaction on the chemical structure of gelatin gels - Application to the design of functional foods by 3D printing. *En cours de rédaction*.

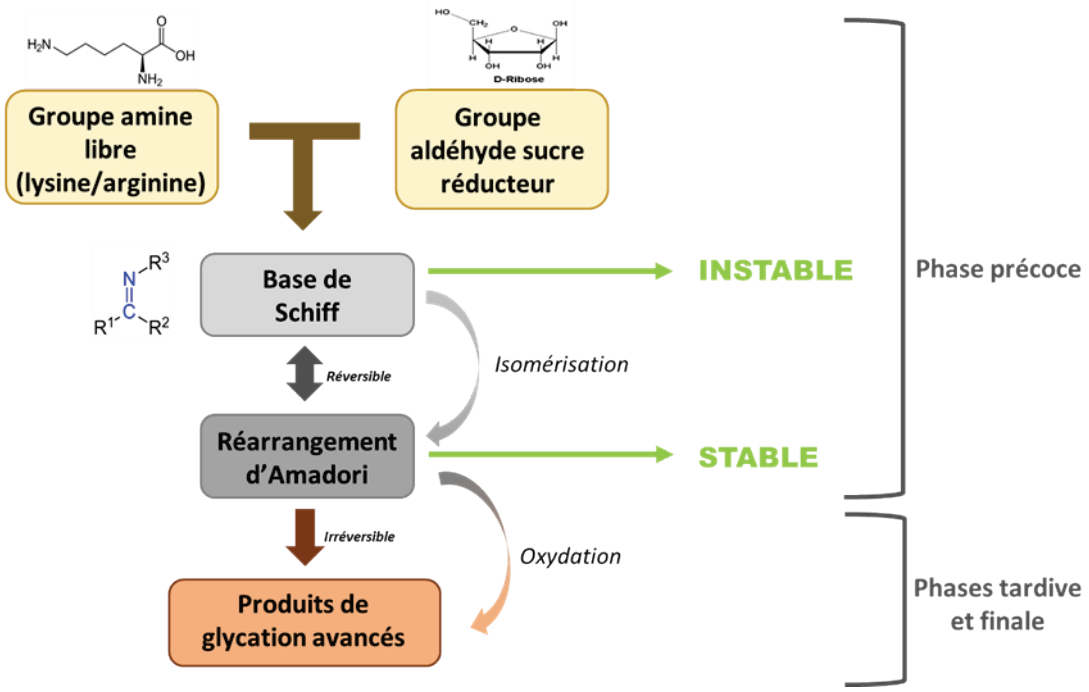


Figure 2.2. *Schéma simplifié de la réaction de glycation. A noter que la glycation est également étudiée dans le domaine médical car impliquée dans des pathologies telles que le diabète ou plus généralement dans le vieillissement cellulaire (Jaisson, Desmons, Gorisse & Gillery, 2017). Les « Advanced Glycation End Products » (AGEs) formés lors de la glycation sont délétères pour la santé, qu'ils soient d'origine alimentaire ou formés dans l'organisme. Les AGEs générés lors des étapes avancées de la réaction peuvent se cumuler avec ceux formés in vivo (Birlouez-Aragon, Morales, Fogliano & Pain, 2010 ; Ramasamy, Yan & Schmidt, 2011). Il est donc important d'accorder une attention particulière à ces composés, notamment en évaluant leur présence dans les aliments (Feng et al., 2021).*

Lors de cette première étape, la fonction carbonyle de l'ose vient réagir avec une fonction amine des acides aminés constituant la protéine. En général, il s'agit des fonctions amines des résidus Lysines et Arginines ou encore de la fonction *N*-terminale de la protéine. Cette réaction va entrainer la formation réversible de glycosylamine *N*-substituée, appelée également base de Schiff, tout en relarguant une molécule d'eau. En raison de l'instabilité de sa liaison aldimine, l'ose peut facilement être relâché, mais il arrive également que la base de Schiff subisse un réarrangement complexe et irréversible appelé réarrangement d'Amadori. Le produit d'Amadori ainsi formé est stable et va ensuite pouvoir emprunter trois voies différentes en fonction du pH (**Figure 2.3**).

A pH inférieur ou égal à 7, on observe la formation de furfural ou d'hydroxymethylfurfural (HMF) alors qu'à un pH supérieur, le produit d'Amadori peut, soit se dégrader en diverses réductones, soit en une variété de produits de fission comme l'acétol ou le pyruvaldéhyde. Ces composés sont très réactifs et peuvent entraîner des réactions en chaîne indésirables, provoquant la formation de produits dont il est important de se préoccuper. En effet, les produits terminaux de glycation ou AGEs sont connus pour faire partie des substances CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) ou ayant

des effets vasculaires, rétiniens et cérébraux (maladie d'Alzheimer) délétères (Académie d'Agriculture de France, 2020). La phase tardive est ainsi caractérisée par de nombreuses réactions mettant en œuvre divers mécanismes réactionnels tels que des oxydations, cyclisations, déshydratations, rétro-aldolisations, isomérisations, *etc.*, entrainant la formation de produits peu caractérisés à ce jour (Liu, Ru & Ding, 2012).

Les AGEs apparaissent donc à des stades ultérieurs du fait de réactions de clivage ou de cyclisation et, sont considérés comme des facteurs associés au vieillissement en raison de leur synthèse endogène (augmentation du stress oxydatif, perturbation endocrinienne, *etc.*) (Ravichandran et al., 2019), mais ils sont également apportés par l'alimentation (Wei, Liu & Sun, 2018). Les conditions de formation des AGEs et leurs conséquences sont discutées dans la section 2.1.3. Dans la littérature, la formation des AGEs est toujours décrite dans la réaction de *N*-glycation, mais à cause du manque de description, il est pour l'heure impossible de dire si la *O*-glycation peut conduire à la formation de ces composés.

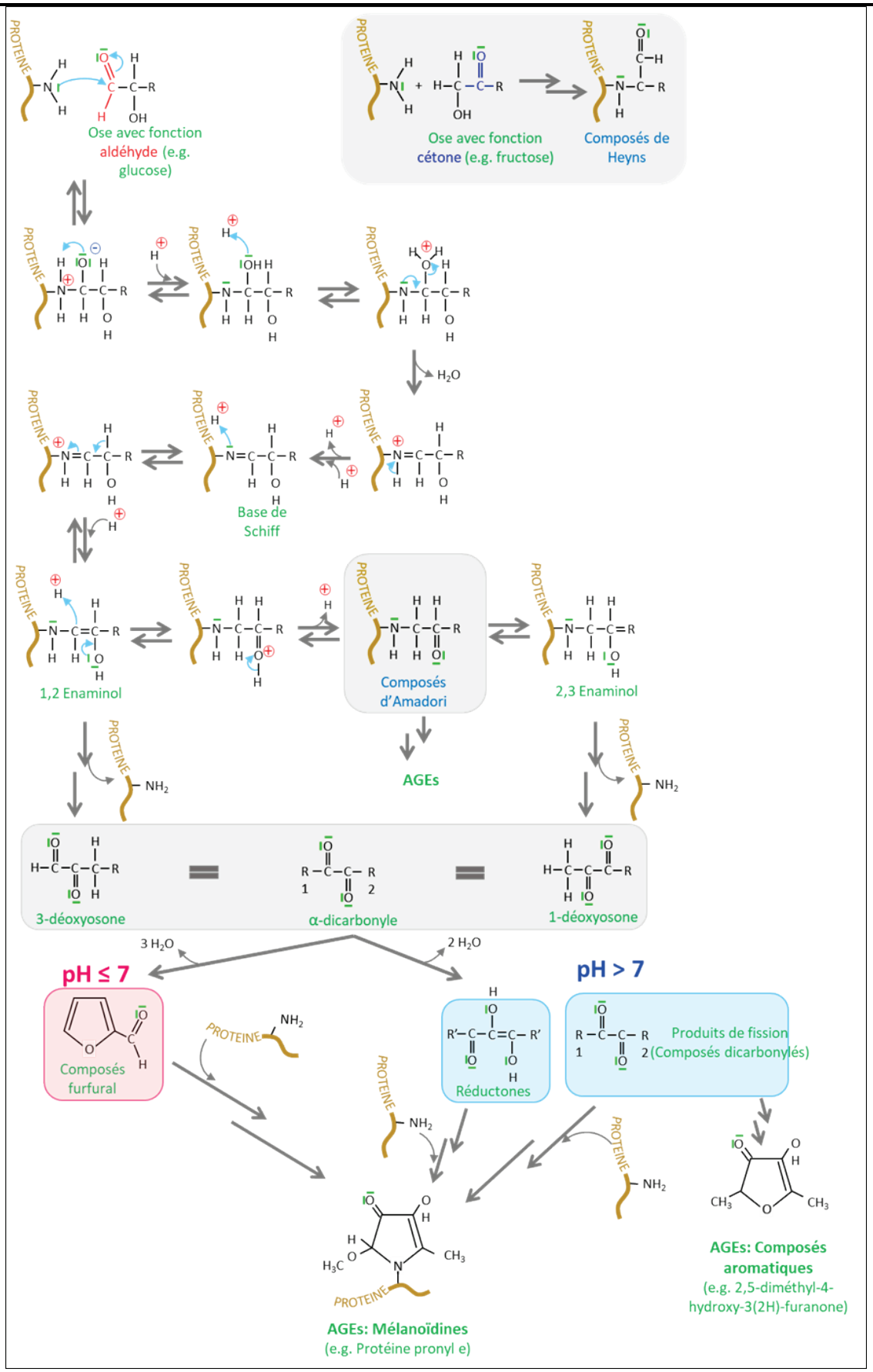


Figure 2.3. *Schéma de la réaction de N-glycation (D'après Portanguen et al., en cours de révision).*

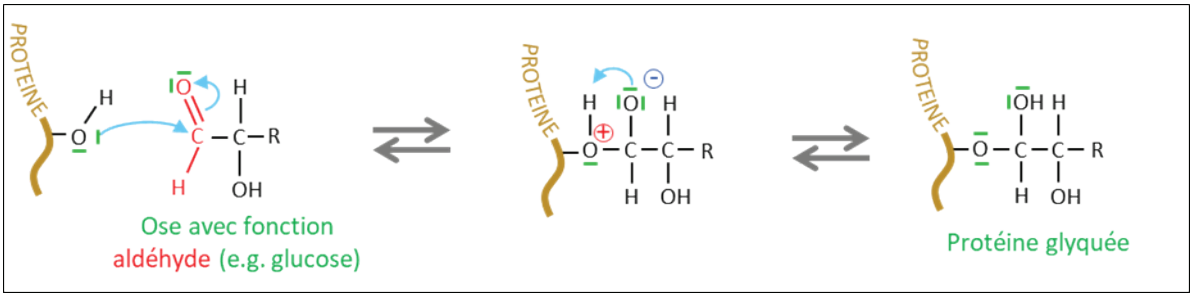


Figure 2.4. *Schéma de la réaction de O-glycation (D'après Portanguen et al., en cours de révision).*

De nombreux paramètres influencent la réaction de glycation dans les aliments : la température et le temps de la réaction, le pH, le type de tampon utilisé, l'activité de l'eau, la présence de métaux activateurs ou inhibiteurs, la présence de certains antioxydants qui limitent la réaction, la concentration et la nature des réactifs tels que les glucides et les acides aminés (Kutzli, Weiss & Gibis, 2021), ainsi que le nombre, la position et la nature des groupes aminés impliqués et, donc la matrice utilisée. Taghavi et al. (2017) rapportent que la formation de liaisons covalentes entre les glucides et les fonctions amines libres des résidus Lysine et Arginine modifie le microenvironnement de ces cibles. Cela conduit à un dépliement partiel du polypeptide et augmente ainsi le nombre de groupes amines disponibles pour la réaction. Cela favorise donc la formation de liaisons transversales intra- et intermoléculaires dans les protéines et peut influencer la structure et donc modifier la texture de la matrice alimentaire.

Le taux de réactivité augmente avec l'augmentation de la température et du temps de réaction jusqu'à ce qu'un seuil soit atteint, après quoi, le taux de réactivité diminue avec l'augmentation de la température. Dans la phase initiale, l'augmentation de température provoque un changement de conformation des protéines et des glucides, ce qui favorise la formation de liaisons. La seconde phase se caractérise par l'agrégation des protéines avec pour conséquence une diminution de l'accessibilité des acides aminés vis-à-vis des glucides, ce qui diminue le taux de réactivité (Kutzli et al., 2021).

Le pH a aussi un impact sur l'état de protonation des réactifs. Ainsi, l'influence du pH sur la réaction dépend de la valeur du pKa du groupe amine. En général, dans des conditions basiques, le groupe amine n'est pas protoné et, les glucides ont tendance à se linéariser, ce qui favorise la réaction de glycation (le pourcentage de formes ouvertes augmente avec le pH et en fonction du type de sucre. Le ribose y est d'ailleurs particulièrement sensible, notamment par rapport au glucose). Le type de tampon influence également la réaction : un tampon phosphate améliore la réaction par rapport à un

tampon citrate. En milieu faiblement tamponné, le pH évolue en cours de réaction. Ceci a été montré par Ajandouz, Tchiakpe, Dalle Ore, Benjiba & Puigserver (2001), dans un milieu contenant du fructose et de la Lysine (ceci est en accord avec nos résultats, présentés en section 2.3.1.3). La gamme de pH testée allait de 4 à 12 et les résultats montrent un effet majeur à partir de pH 8, avec un maximum à pH 10. Le milieu réactionnel a tendance à s'acidifier en raison du relargage de protons (H^+) par les Lysines glyquées. Etant donné que la libération de protons est d'autant plus forte que le pH est basique, il est nécessaire de tamponner correctement le milieu initial pour assurer une vitesse réactionnelle constante et élevée.

Le **Tableau 2.1** indique les paramètres expérimentaux les plus couramment utilisés dans la littérature pour la réaction de glycation. A noter que les gammes de température et de temps de réaction sont très larges, car elles sont interdépendantes (une glycation à 130 °C est possible et efficace, à condition que le temps de réaction soit très court et inversement). Il est difficile de donner une fourchette des concentrations en ribose fréquemment utilisées, car celles-ci dépendent fortement du contexte de l'expérience et de la matrice utilisée.

Tableau 2.1. *Paramètres expérimentaux communément appliqués pour la réaction de glycation.*

Paramètres expérimentaux	Gamme	Références
Température (°C)	50 – 130	Stevenson et al., 2020
Durée	0,25 h - plusieurs jours	Ajandouz et al., 2001
pH	8 - 12	Etxabide et al., 2015
Activité de l'eau	0,5 – 0,8	Liu et al., 2012

L'activité de l'eau (a_w) joue également un rôle important dans la réactivité de la matrice (Hrynets, Ndagijimana & Betti, 2013). Lorsque la teneur en eau est faible, les réactifs sont plus concentrés, mais la mobilité des molécules est réduite, ce qui diminue la vitesse réactionnelle. Lorsque la teneur en eau augmente, l'a_w augmente dans le même temps que la mobilité et la diffusion des molécules, ce qui augmente le taux de réactivité (Hrynets et al., 2013). Les taux de réaction les plus rapides sont atteints lorsque l'a_w est comprise entre 0,50 et 0,80 (Liu et al., 2012). Lorsque la teneur en eau dépasse ces valeurs, les réactifs se diluent et la vitesse de la réaction de glycation diminue. A noter que l'a_w des produits alimentaires est en général élevée (0,95 à 0,99 pour les produits carnés et la viande fraîche (Fennema & Carpenter, 1984), quand celle de gels de gélatine peut atteindre 0,99 (Lebert, Nicolas, Portanguen & Lebert, 2007), ce paramètre devient donc un facteur limitant de la réaction. Le poids moléculaire joue également un rôle dans la réactivité, car les poids moléculaires élevés limitent la mobilité moléculaire et les changements de conformation en raison d'un encombrement stérique

important (Hrynets et al., 2013).

Dans leur revue de la littérature sur la glycation des protéines végétales, Hrynets et al. (2013) indiquent que le paramètre le plus important pour la réaction de glycation est la température, suivie de l'humidité relative. Dans l'industrie alimentaire, la méthode habituelle pour obtenir des protéines glyquées est le chauffage à sec, suivi d'un stockage des préparations lyophilisées pendant 1 à 3 semaines (Zhu, Damodaran & Lucey, 2008). Cependant, ces conditions rendent difficile les contrôles de la réaction, de la dénaturation des protéines (French, Harper, Kleinholz, Jones & Green-Church, 2002) et des changements de couleur (Tanaka, Kunisaki & Ishizaki, 1999). En outre, plus le temps de réaction est long, plus la présence de composés antinutritionnels augmente (Brands, Alink, van Boekel & Jongen, 2000).

Plusieurs techniques ont récemment été mises en œuvre pour améliorer la réaction de glycation. Par exemple, les ultrasons en condition humide, les champs électriques pulsés, l'irradiation ou le prétraitement à haute pression peuvent être appliqués aux protéines végétales pour les déplier et ainsi augmenter l'accessibilité des groupes réactifs (Hrynets et al., 2013). Koch, Hummel, Schuchmann & Emin (2018) ont travaillé sur l'extrusion de protéines de lactosérum visqueuses. Des températures élevées (80 à 180 °C) ont permis de favoriser la glycation. L'extrusion a créé des contraintes mécaniques et une pression élevée, ce qui a réduit le temps de réaction. Ces résultats peuvent trouver une application directe en I3D. L'électrofilage est une technique qui a également un impact sur la réaction de glycation. En appliquant cette technique à des protéines de lactosérum et de la maltodextrine, Ines Kutzli, Gibis, Baier & Weiss (2018) ont pu créer des fibres. Sous cette forme, la maltodextrine et les protéines de lactosérum étaient plus proches les unes des autres et ont pu être conjuguées avec un rendement élevé (environ 44 %, contre 5 à 10 % avec les méthodes de chauffage à sec).

Dans tous les cas, un chauffage est nécessaire pour initier ou accélérer la réaction de glycation. Cependant, le chauffage peut altérer les molécules de manière irréversible, c'est pourquoi le contrôle de ce paramètre dépend des matrices utilisées. Par exemple, l'actomyosine, un complexe protéique présent dans la viande, est facilement dénaturé par le chauffage. Chez la daurade, l'actomyosine forme des agrégats insolubles à partir de 40 °C et les changements de conformation commencent dès 30 °C (Yongsawatdigul & Park, 2003). Liu, Zhao, Yang, Li, Xiong & Xie (2011) ont observé que l'actomyosine de porc était plus thermostable que l'actomyosine de poisson, mais Astruc et al. (2012) ont également montré que la dénaturation des protéines myofibrillaires commençait dès 40 °C sur une section de muscle bovin et qu'elle était initiée dès 20 °C, lorsque la section de muscle était préalablement incubée

à 5,5. Ainsi, l'origine de l'actomyosine a un impact sur le choix de la température réactionnelle. Cette variabilité des températures de dénaturation des protéines rend difficile l'établissement de paramètres réactionnels universels pour la glycation (Hrynets et al., 2013).

Comme de nombreux paramètres influencent la réaction de glycation et qu'elle conduit à la formation de divers produits, il serait intéressant de mesurer la progression de la réaction. Il n'existe cependant pas de méthode directe pour la déterminer. Un moyen indirect consiste à mesurer la diminution des fonctions libres impliquées dans la réaction, ou à mesurer les produits formés. En effet, la liaison des glucides réducteurs aux acides aminés conduit à une diminution du nombre de groupes aminés libres, qui peut être mesurée expérimentalement par spectroscopie vibrationnelle (Li, Zhu, Xue, Chen, Chen & Wang, 2015). Une augmentation du poids moléculaire des protéines auxquelles les glucides se lient est également observée, comme le montrent des analyses SDS-PAGE (Liu et al., 2017 ; Sun, Hayakawa & Iszumori, 2004 ; Wang et al., 2020). Ces formations de nouvelles liaisons covalentes peuvent également être suivies indirectement par micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Dans l'étude de Wang et al. (2020), les diminutions progressives de l'absorbance des groupes -OH des polysaccharides et des liaisons -NH, induites par la glycation, ont été attribuées à la formation de liaisons covalentes entre ces groupes (entre des isolats de protéines d'arachide et de la gomme arabique). Cependant, à l'inverse, Wang, Ren, Su & Yang (2018) ont observé par la même technique une augmentation de l'absorbance associée aux groupes -OH dans le blanc d'œuf. Ils en ont conclu que la liaison des glucides aux protéines augmentait le nombre de groupes hydroxyles, en raison de la réaction de condensation des groupes aminés primaires des protéines avec les groupes carbonyles des glucides réducteurs qui forment des bases de Schiff, avec la libération d'eau et, avec la consommation des groupes aminés. Néanmoins, Bhat & Karim (2014) n'ont pas observé de différences entre les spectres infrarouge des gels de gélatine de poisson contenant ou non des glucides. Ces résultats montrent que la FT-IR peut être utilisée comme outil pour suivre la réaction de glycation, mais que cela n'est pas suffisant pour élucider les mécanismes réactionnels impliqués.

Dans les matrices alimentaires, des approches rhéologiques ont permis d'établir le lien entre la texture et la glycation sans pour autant pouvoir en dégager clairement le mécanisme. Cela rend cette réaction difficile à contrôler, mais en même temps intéressante, en raison des nombreuses propriétés susceptibles d'être apportées aux matrices alimentaires.

2.1.2. L'intérêt d'utiliser la réaction de glycation dans des matrices alimentaires

De récentes études ont été menées pour évaluer l'intérêt de la réaction de glycation comme méthode d'amélioration des propriétés fonctionnelles des aliments, notamment en termes de propriétés organoleptiques et texturales, ou pour l'incorporation de nouveaux ingrédients. Par exemple, Wang & Zhang (2023) ont montré que la glycation de la séricine de soie par le xylose augmentait la solubilité de la molécule dans l'eau, sa capacité antioxydante et modifiait son odeur pour la rendre acceptable pour son incorporation dans des aliments fonctionnels. Pour développer des boissons riches en protéines, Schneider, Bu & Ismail (2023) ont pu contrôler la réaction de glycation, dans les phases initiales, pour produire un ingrédient à base de protéines de pois et de maltodextrine. Le contrôle de la réaction étant assuré, d'après ces auteurs, par une maîtrise des conditions opératoires (température, humidité relative, *etc*.) et par des changements modérés de couleur. L'amélioration de la solubilité de ces protéines par la glycation a permis d'obtenir une digestibilité *in vitro* de 100 %. Dans une approche inverse, le devenir gastro-intestinal des composés glyqués a été étudié par Zhang, Chen, Panda & Benjamin (2023), qui a montré que les conjugués obtenus à partir d'isolat de protéines de lactosérum et de stachyose présentaient une structure réticulée caractéristique induisant une résistance aux enzymes digestives telles que la pepsine et la trypsine. Cette modulation de la digestibilité des protéines et des glucides permet d'utiliser ces conjugués comme ingrédients fonctionnels pour contrôler la libération de composés actifs dans le tube digestif.

Des travaux récents ont combiné la glycation avec des procédés. Chen et al. (2022) ont notamment montré que les ultrasons accéléraient la glycation entre les protéines de riz et le dextrane. La structure secondaire des protéines a été affectée, avec une diminution de 10,0 % de la quantité de feuillets-β et une augmentation de 10,6 % de la quantité de pelotes statistiques. La solubilité ainsi que les propriétés moussantes et émulsifiantes des conjugués obtenus ont été augmentées. Pour Cui et al. (2023), les ultrasons ont amélioré le greffage du dextrane sur l'albumine de sérum bovin et la caséine. La structure secondaire a également été affectée et, la solubilité et la stabilité thermique, ainsi que les propriétés moussantes et émulsifiantes, ont été améliorées. Le couplage d'un procédé comme les ultrasons avec la glycation a donc été bénéfique et les conjugués obtenus permettent d'envisager la conception de nouveaux vecteurs destinés à protéger des molécules de l'oxydation.

Dans le cas de collagène hydrolysé de peau de carpe, la glycation induite par la glucosamine peut

créer des peptides réactifs qui ont un effet de renforcement du goût salé (Yu et al., 2022). Cette découverte suggère que la glycation pourrait contribuer à réduire les apports en sel dans l'alimentation (Sun et al., 2004).

La glycation peut également modifier les propriétés fonctionnelles des protéines, telles que la stabilité à la chaleur, la solubilité, les propriétés émulsifiantes, moussantes et texturales (Nooshkam et al., 2020 ; Oliver, Melton & Stanley, 2006). L'augmentation de la solubilité des protéines après la réaction de glycation s'explique par une augmentation modérée de la charge négative des protéines apportée par les groupes hydroxyles des glucides. Il en résulte un changement dans l'équilibre entre l'hydrophilie et l'hydrophobie des protéines, ce qui modifie leur degré de solubilité. L'augmentation de la solubilité des protéines après la glycation a été confirmée par Liu et al. (2012) et Katayama, Shima & Saeki (2002), qui ont constaté que les protéines myofibrillaires de poulet et de coquille Saint-Jacques avaient un taux de solubilité plus élevé après la réaction.

La réaction de glycation peut également favoriser des activités antimicrobiennes et antioxydantes dans les aliments (Nooshkam et al., 2020 ; Oliver et al., 2006). Par exemple, Liu, Wang, Zhang, Wang & Kong (2019) ont constaté que la nitroso-hémoglobine glyquée, préparée à partir de cellules sanguines porcines, réduisait les résidus de nitrite et inhibait l'oxydation des lipides et la croissance des *Enterobacteriaceae* dans les saucisses, démontrant ainsi le potentiel de l'utilisation de la réaction de glycation pour produire des substituts au nitrite de sodium dans les produits à base de viande (Liu et al., 2019). Il a également été observé que les produits de la glycation dérivés de galacto-oligosaccharides amélioraient la stabilité physico-chimique, inhibaient l'allergénicité et prévenaient les maladies coliques (Liang et al., 2022).

Bien que ces derniers résultats nécessitent des études complémentaires pour confirmer et mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, il est désormais bien établi que les réactions de glycation ont un grand potentiel pour les applications en industrie alimentaire, afin d'améliorer la fonctionnalité des protéines et des aliments. La glycation peut également entraîner une augmentation de la viscosité ou des propriétés viscoélastiques, ce qui peut améliorer la capacité de gélification (Liu et al., 2012). La glycation a donc un impact sur les propriétés mécaniques des matrices protéiques, mais les résultats sont contradictoires. Certaines études montrent une augmentation de la résistance des matrices, tandis que d'autres décrivent le contraire. Pour Li et al. (2015), des films obtenus à partir d'isolats de protéines d'arachide et de gomme arabique présentent des valeurs de résistance à la traction plus élevées que les films non-glyqués (1,76 MPa *vs.* 0,77 MPa, respectivement). Ce résultat est en accord avec celui de Liu et al. (2017), obtenu sur un film protéique formulé à partir du même

substrat. Une augmentation de la résistance à la traction avec l'augmentation de la concentration en xylose avait alors été observée. Cette augmentation s'est produite jusqu'à 10 % de xylose et a ensuite diminué. Ces résultats ont été confirmés par des observations au microscope électronique à balayage (MEB), qui ont révélé une densification progressive de la structure du gel jusqu'à 10 % de xylose. Les auteurs ont suggéré que la matrice était probablement saturée en glucides au-delà de cette valeur. Dans une autre étude, des gels de gélatine de poisson contenant du ribose ont présenté une résistance à l'étirement plus élevée (4 MPa *vs*. 2,8 MPa) et un pourcentage d'allongement à la rupture plus élevé que ceux préparés sans ribose (Bhat & Karim, 2014). Des résultats équivalents ont donc été obtenus sur deux matrices différentes : animale et végétale.

Matsudomi, Nakano, Soma & Ochi (2002) ont étudié les effets de la glycation sur du blanc d'œuf lyophilisé en présence de galactomannanes. Ils ont conclu que, dans leurs conditions réactionnelles, les gels glyqués de blanc d'œuf étaient plus fermes que les gels témoins. La fermeté des gels augmentait avec l'augmentation du rapport glucides/protéines, de 1:8 à 1:4, mais avait tendance à diminuer lorsqu'un rapport seuil était atteint au fur et à mesure que la quantité de glucides augmentait (rapports 1:2 à 1:0,5). Et ce, jusqu'à ce que la fermeté des gels soit inférieure à celle des gels témoins (rapport 1:0,5). Sun et al. (2004) ont réalisé des tests de compression uniaxiale sur des gels de protéines de blanc d'œuf glyqués avec de l'isomalto-oligosaccharide ou du fructo-oligosaccharide et, ont observé une augmentation progressive de la fermeté et de l'élasticité des gels obtenus en fonction du temps de glycation, jusqu'à 72 h. A 96 h de glycation, une diminution significative de la fermeté et de l'élasticité des gels a été observée : -25 % sur la fermeté et -6 % sur l'élasticité avec l'isomalto-oligosaccharide et -5 % sur la fermeté et -7 % sur l'élasticité avec le fructo-oligosaccharide, respectivement. Les mêmes auteurs ont effectué une analyse rhéologique de leur blanc d'œuf glyqué avec de l'isomalto-oligosaccharide ou du fructo-oligosaccharide. Pendant la phase de chauffage, les valeurs plus élevées du module élastique (G')[12] des gels de blanc d'œuf glyqués à partir de 90 °C, par rapport aux gels non glyqués, ont été attribuées à une augmentation des interactions hydrophobes entre les chaînes de protéines pendant la formation du gel. L'augmentation du module G' pour les gels glyqués pendant la phase de refroidissement, qui était toujours plus élevée que celle des gels non-glyqués, suggère que la structure du gel a continué à se renforcer pendant le refroidissement, en raison de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, qui étaient présentes en plus grand nombre que dans les gels non-glyqués. Wang et al. (2020) ont observé les gels glyqués et non-glyqués par MEB

12 Une définition des paramètres rhéologiques est donnée dans le Chapitre 3.

et ont montré un réseau plus fin, plus dense et plus uniforme dans les gels glyqués (chauffés à 60 °C pendant 72 h) par rapport au gel témoin. Ils ont suggéré que des liaisons covalentes entre les glucides et les protéines apparaissaient au cours de la glycation, entraînant une augmentation du poids moléculaire des protéines. Sun et al. (2004) et Liu et al. (2017) ont effectué des tests de compression uniaxiale sur des gels d'ovalbumine glyqués avec du glucose, du fructose et du psicose. Ils ont également constaté que les gels glyqués présentaient des valeurs de contrainte de rupture et de résistance plus élevées que les gels non-glyqués.

Toutes ces études conduites sur les protéines d'arachide, la gélatine de poisson et le blanc d'œuf tendent à montrer une augmentation de la force du gel sous l'effet de la glycation, bien qu'une diminution de la force du gel soit parfois observée lorsqu'un certain seuil de concentration en glucide est atteint. Les auteurs attribuent l'augmentation de la résistance du gel à l'augmentation des interactions entre les chaînes de protéines après la glycation. En effet, plusieurs études ont montré que la liaison des glucides aux chaînes protéiques avait un impact sur la structure des protéines. Par exemple, Wang et al. (2020) ont observé une augmentation des feuillets-β intra- et interchaînes dans les protéines du blanc d'œuf et, une diminution des hélices-α après la réaction de glycation. Plusieurs auteurs ont émis des hypothèses sur le mécanisme moléculaire de la glycation et son impact sur les structures de gel des protéines. Lin et al. (2015) ont suggéré que la glycation augmenterait les interactions entre les chaînes de protéines dans l'isolat de protéines d'arachide, en exposant les groupes sulfhydryle (-SH) et les chaînes latérales libres hydrophobes des acides aminés. Cette hypothèse a été confirmée par Liu et al. (2017) qui ont proposé un modèle explicatif sur l'effet de texturation de la glycation. Ces auteurs ont suggéré que la liaison des glucides à la protéine tendrait à déplier celle-ci, exposant ainsi le noyau hydrophobe de la protéine où se trouvent les groupes sulfhydryles. Ceci conduirait à la formation de liaisons disulfures et à l'établissement d'interactions hydrophobes entre les protéines de la matrice de protéines d'arachide, ce qui donnerait une grande force au réseau.

Certaines études ont néanmoins permis d'observer le phénomène inverse après la glycation. Par exemple, Zhao, Zhou, Liu, Zhang, Chen & Wu (2016) ont étudié un isolat de protéines de soja glyqué avec du glucose et du maltose, traité par ultrasons. Les auteurs ont mesuré une diminution du module G' dans les gels après glycation, suggérant que la glycation tend à en affaiblir la structure. Ils ont émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait être dû à l'effet protecteur des glucides contre la dénaturation des protéines de soja, en particulier en fonction de la température, empêchant le gel de protéines de soja de devenir plus ferme. Yang et al. (2021) ont travaillé sur la glycation du blanc d'œuf

par le *D*-ribose et ont constaté que les valeurs de fermeté, de cohésion et d'élasticité étaient significativement plus faibles pour les gels glyqués que pour les gels non-glyqués : les valeurs de fermeté et d'élasticité étaient inférieures de 30 % à celles des gels témoins, même lorsque la concentration en ribose augmentait. L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène est que le *D*-ribose est un bien meilleur agent réducteur que les autres glucides et, qu'il est susceptible de réduire les liaisons disulfures présentes dans le gel, affaiblissant ainsi la structure du gel. Une autre hypothèse est que la liaison des glucides aux parties hydrophobes des protéines les rendrait plus hydrophiles, entraînant une réduction des interactions hydrophobes entre les protéines du réseau. Ces interactions jouant un rôle structurel essentiel, leur disparition entraînerait une perte des propriétés de résistance mécanique du gel. Les mêmes auteurs ont constaté que la valeur d'adhésion du blanc d'œuf glyqué était doublée lorsque la concentration en ribose passait de 20 à 60 mg pour 30 mL de blanc d'œuf. Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène : 1) le ribose peut former des liaisons hydrogène avec l'eau présente dans le gel, lui permettant d'être retenue dans la matrice protéique, et 2) la formation de liaisons covalentes lors de la glycation permettrait la formation d'un réseau plus fin et plus compact qui piégerait les molécules d'eau au sein de la matrice. Les observations au MEB ont révélé une structure plus poreuse, granuleuse et hétérogène des gels glyqués par rapport aux gels témoins qui possédaient une structure continue beaucoup plus lisse. De plus, la microstructure des gels glyqués présentait localement des zones plus compactes, attribuées à la formation d'agrégats fibreux. Les hypothèses émises par Yang et al. (2021) vont à l'encontre de l'hypothèse précédente formulée par (Liu et al., 2017). En tout cas, l'ensemble de ces études montre que la glycation a des effets sur les propriétés mécaniques des gels protéiques, mais que ces effets varient en fonction des protéines, des oses et des conditions réactionnelles. L'effet de la glycation sur la texture des gels protéiques et les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent encore mal élucidés.

2.1.3. Les produits de glycation avancés

2.1.3.1. Relation entre les produits de glycation avancés et la santé humaine

Comme expliqué *supra*, les produits de glycation avancés (AGEs) sont les produits finaux de la réaction de *N*-glycation. Il était, autrefois, admis que les AGEs se formaient *in vivo*, en raison de la quantité élevée de glucides dans le sang des personnes diabétiques (Brownlee, 1995), mais il a été démontré, par la suite, qu'ils provenaient également de l'alimentation. Un lien a été établi entre les AGEs alimentaires et la résistance à l'insuline et le diabète chez l'Homme (Vlassara & Striker, 2011).

Les AGEs alimentaires formés par la réaction de glycation lors de la cuisson des aliments sont dits exogènes, alors que les AGEs provenant des réactions de glycation se produisant dans tous les tissus et fluides corporels, dans des conditions physiologiques, sont dits endogènes.

La formation d'AGEs fait partie du métabolisme, mais si les niveaux d'AGEs dans les tissus et dans la circulation sanguine sont trop élevés, ils peuvent devenir pathogènes. De nombreuses études portant sur la contribution des AGEs endogènes et exogènes en matière d'apparition et de progression des maladies chroniques, en particulier au cours du vieillissement, indiquent que les AGEs augmentent le stress oxydatif et l'inflammation (Vlassara et al., 2002). Il a ainsi été postulé que les AGEs exogènes (principalement, la carboxyméthyl lysine - CML et le méthylglyoxal) étaient la principale source dans l'organisme, tandis que les AGEs endogènes n'en étaient qu'une fraction mineure (Vlassara et al., 2002). Comme l'ont montré plusieurs études, les AGEs s'accumulent progressivement, avec l'âge, dans le cerveau et dans les autres organes du système nerveux central des personnes atteintes de maladies neurodégénératives, notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Cai et al., 2014). En effet, les AGEs peuvent provoquer un dysfonctionnement cardiaque ou vasculaire, en conduisant au développement de la rigidité des vaisseaux sanguins et de la fibrose cardiaque et, en stimulant l'inflammation et le stress oxydatif par l'intermédiaire du Récepteur des AGEs (RAGE) (Hegab, Gibbons, Neyses & Mamas, 2012). Les AGEs contribuent également de manière significative au stress oxydatif et à l'inflammation chez les personnes atteintes de diabète, ce qui a suscité des recherches intensives concernant la surcharge en AGEs en tant que cause du diabète, à la fois d'un point de vue diététique et pharmaceutique (Vlassara & Uribarri, 2014).

Comme les AGEs endogènes se forment à des températures plus basses en conditions physiologiques (37 °C) que dans la plupart des procédés de transformation des aliments, leur diversité est largement inférieure. Quatre types de mécanismes ont été identifiés, conduisant à la formation des AGEs endogènes (Ahmed, Argirov, Minhas, Cordeiro & Thornalley, 2002) : 1) l'autoxydation des monosaccharides (glycosylation autoxydante) ou la dégradation des saccharides non liés aux protéines, 2) la fragmentation des bases de Schiff, 3) la dégradation des fructosamines, et 4) les composés α,β-dicarbonylés formés par la dégradation des intermédiaires glycolytiques et la peroxydation des lipides. Les AGEs alimentaires de faible poids moléculaire (AGE LMW) sont facilement absorbés par l'organisme dans des modèles animaux (rats), mais plus de 80 % d'entre eux sont excrétés dans l'urine dans les 72 h (Sebekova, Faist, Hofmann, Schinzel & Heidland, 2003). Les AGEs liés aux peptides, c'est-à-dire les AGEs de poids moléculaire élevé (HMW), sont également bien absorbés, mais seuls 2 à 30 % d'entre eux sont excrétés dans l'urine des rats (Sebekova et al., 2003).

Comme observé dans les modèles animaux, les AGEs de faible poids moléculaire sont facilement excrétés dans l'urine humaine (50-60 %), alors que les AGEs de poids moléculaire élevé (HMW) sont excrétés à un taux beaucoup plus faible (2-15 %) (Poulsen et al., 2013). Dans cette dernière étude, des AGEs exogènes ont été trouvés dans tous les tissus du corps, mais en plus grande quantité dans le foie et les reins. Ces AGEs pourraient interagir avec des récepteurs cellulaires tels que RAGE (Ramasamy et al., 2011). Ce récepteur cellulaire est présent dans un grand nombre de tissus et, l'activation de RAGE induit un stress oxydatif et une inflammation, mais elle pourrait également être liée au diabète et à la maladie d'Alzheimer (Ramasamy et al., 2011 ; Wang, Tu, Liu, Liu, Huang & Xiao, 2013). Les AGEs semblent se lier au RAGE, mais n'induisent pas de réponse inflammatoire (Poulsen et al., 2013) ; seuls les AGEs HMW seraient capables de se lier au récepteur (Wang et al., 2013). Les AGEs HMW se forment dans les aliments transformés, mais certains d'entre eux sont dégradés dans l'intestin et absorbés dans l'organisme sous forme d'AGEs LMW (poids moléculaire faible) (Poulsen et al., 2013). Certains auteurs ont rapporté qu'un apport alimentaire élevé en AGEs HMW en augmentait l'absorption par l'organisme (Birlouez-Aragon et al., 2010). Un autre récepteur cellulaire (AGER1), présent dans la membrane plasmique des macrophages, est capable d'éliminer les AGEs et de réduire la réponse inflammatoire grâce à l'interaction AGE-RAGE (Poulsen et al., 2013). Sur la base de ces informations, il semble que les AGEs HMW soient susceptibles de pénétrer dans l'organisme, mais que seule une petite fraction d'entre eux puisse activer des récepteurs cellulaires tels que RAGE. Cependant, un apport alimentaire élevé en AGEs HMW pourrait en augmenter la proportion capable de se lier à RAGE, augmentant ainsi la réponse inflammatoire.

Plus récemment, d'autres effets néfastes des AGEs ont été avancés ou investigués, comme leur rôle dans le syndrome métabolique. Ainsi, une consommation élevée d'AGEs augmente le risque d'obésité abdominale, ce qui suggère que les recommandations visant à limiter la consommation d'AGEs pourraient s'avérer utiles (Angoorani, Ejtahed, Mirmiran, Mirzaei & Azizi, 2016). Les AGEs alimentaires jouent également un rôle dans les maladies cardio-métaboliques, agissant probablement en synergie avec les AGEs endogènes (Luevano-Contreras, Gomez-Ojeda, Macias-Cervantes & Garay-Sevilla, 2017). Yacoub et al. (2017) ont également émis l'hypothèse que les AGEs alimentaires influençaient négativement la composition du microbiote humain. Plus récemment, une hypothèse a été émise selon laquelle les régimes riches en AGEs et en glucides formant des AGEs conduisaient à une mauvaise interprétation de la menace des allergènes alimentaires, favorisant ainsi le développement d'allergies alimentaires (Smith, Masilamani, Li & Sampson, 2017). Cette hypothèse pourrait expliquer, au moins en partie, l'explosion des allergies alimentaires au cours des dernières

décennies dans les pays occidentaux, où les régimes alimentaires ont tendance à être riches en AGEs (dérivés d'huiles, viandes cuites, fromages, aliments riches en glucides).

Toutefois, il convient de noter qu'il existe de plus en plus de preuves que certains composés de la glycation, présents dans les aliments et identifiés comme étant des constituants des mélanoïdines, pouvaient agir en tant qu'agents chimio-protecteurs et inhiber la croissance de cellules tumorales (Marko et al., 2003). Par exemple, Lindenmeier, Faist & Hofmann (2002) ont constaté que les protéines pronylées, qui font partie des mélanoïdines de la croûte de pain, induisaient l'activité de la glutathion *S*-transférase dans les cellules CaCO-2 (cellules du côlon) et pouvaient donc présenter une activité antioxydante chimio-préventive *in vivo*. Les mélanoïdines sont des polymères nitrogénés, caractéristiques de la phase finale de la glycation. Leur présence, signe de l'état d'avancement de la réaction, est mise en évidence par l'apparition d'une coloration orangée typique. Les structures de ces composés n'ont été que partiellement élucidées à ce jour.

Pour toutes ces raisons, l'utilisation de la glycation dans les aliments justifie une certaine prudence et ne doit être envisagée que si la réaction de glycation peut être contrôlée et stoppée avant la formation d'AGEs.

2.1.3.2. Les paramètres pour limiter la présence des produits avancés de glycation dans les aliments

Les stratégies d'atténuation de la charge en AGEs dans les aliments sont liées soit au processus lui-même, soit aux précurseurs impliqués dans leur formation.

En ce qui concerne les facteurs internes impliqués dans la formation des AGEs, il existe des précurseurs carbonylés et des précurseurs aminés. Les précurseurs carbonylés sont principalement des glucides réducteurs. Différents glucides peuvent être impliqués dans la formation des AGEs, mais dans l'alimentation, il s'agit principalement du glucose, du fructose, du lactose ou du maltose. Les AGEs dérivés du glucose semblent être les plus courants dans l'alimentation. En effet, les boissons gazeuses, les boissons aux fruits édulcorées aux glucides, les boissons pour sportifs, les jus de fruits, les snacks, les fruits secs, les gâteaux et les céréales contiennent davantage d'AGEs dérivés du glucose (Takeuchi et al., 2015). Cependant, les composés 1,2-dicarbonylés tels que le méthylglyoxal ou le glucosone formés à partir des glucides pendant le traitement thermique sont également des molécules très réactives pour la glycation et, peuvent être considérées comme des précurseurs d'AGEs dans les aliments (Degen, Hellwig & Henle, 2012). La peroxydation des lipides produit également des dérivés dicarbonylés et, il a été constaté que les aliments riches en matières grasses contenaient des niveaux

plus élevés de CML que leurs équivalents pauvres en matières grasses (Uribarri et al., 2010). Concernant les précurseurs aminés, les deux principaux sites actifs de la réaction de glycation sont le groupe *N*ε-amine de la Lysine et le groupe guanidine de l'Arginine, ainsi que les groupes aminés *N*-terminaux des chaînes (poly)peptidiques. Par conséquent, les aliments riches en Lysine et en Arginine, tels que la viande et les produits laitiers et, les produits contenant des acides aminés libres, tels que la sauce soja, sont susceptibles de former des AGEs par glycation au cours de la transformation. La diversité des AGEs produits dépend de l'accessibilité des groupes aminés actifs à la surface des protéines (Uribarri et al., 2010 ; Poulsen et al., 2013).

Les facteurs externes impliqués dans la formation des AGEs sont liés à la transformation des aliments, qui a un impact direct sur la réaction de glycation. Ainsi, le temps de réaction, la température, le pH et la disponibilité de l'eau ont tous un effet significatif sur la vitesse réactionnelle et, par conséquent, sur le niveau des AGEs dans les aliments cuits. Comme pour d'autres substances toxiques induites par la chaleur, des temps de cuisson plus courts et des températures de cuisson plus basses réduisent la formation d'AGEs. Cependant, la formation de ces composés devrait également être étudiée pour les technologies non thermiques émergentes dans l'industrie alimentaire (champs électriques ou traitement par plasma froid), car d'autres intermédiaires de la réaction de glycation sont susceptibles d'être générés et peuvent induire la formation d'AGEs (Zhang, Wang & Fu, 2020). Il a également été démontré qu'un pH de 10 était optimal pour la réaction de glycation, du fait d'une vitesse de réaction qui augmente jusqu'à atteindre un pic à cette valeur (Sharma, Kaur, Thind, Singh & Raina, 2015). L'utilisation d'ingrédients acides tels que le jus de citron ou le vinaigre réduirait donc la charge en AGEs des aliments cuits (Uribarri et al., 2010). Il a été constaté que la cuisson sèche favorisait la formation d'AGEs exogènes, tandis que les méthodes de cuisson telles que la cuisson à la vapeur ou par ébullition, qui impliquent un niveau d'humidité plus élevé et une température plus faible, diminuaient la vitesse de la réaction de glycation, en raison de la dilution des réactifs dans la phase aqueuse (Sharma et al., 2015 ; Uribarri et al., 2010). Il convient également de noter que la réaction de glycation est connue pour être accélérée en présence de métaux de transition tels que le fer ou le cuivre (Poulsen et al., 2013). Enfin, l'ajout d'antioxydants (tels que les polyphénols) capables de piéger les radicaux libres ou les intermédiaires de la réaction de glycation est également une technique efficace pour réduire la charge en AGEs des aliments cuits (Anis & Sreerama, 2020). Ainsi, les travaux récents de Wang et al. (2023) ont montré que certains polysaccharides de fleurs de bananier, présentant une puissante activité antioxydante, étaient capables de piéger les précurseurs dicarbonylés des AGEs tels que les CML. Ces propriétés peuvent être utilisées dans la conception

d'aliments fonctionnels pour les patients diabétiques. La modulation du procédé a un impact sur la formation des AGEs, mais aussi sur les propriétés organoleptiques de l'aliment, ce qui nécessite de trouver des compromis afin de maintenir la valeur hédonique. Il est à noter qu'au niveau endogène, la voie de détoxification métabolique limite la formation des AGEs, mais des inhibiteurs endogènes tels que des produits pharmaceutiques, des enzymes ou des piégeurs endogènes peuvent également être utilisés.

2.1.4. Application de la réaction de glycation à une matrice alimentaire - Effets de la matière première et des conditions opératoires

2.1.4.1. La gélatine

La gélatine est un ingrédient qui modifie les propriétés fonctionnelles et la texture des aliments. Elle permet de modifier la consistance, l'élasticité et la stabilité d'un produit, grâce à ses propriétés gélifiantes, tensioactives et émulsifiantes et à sa capacité à former des films. Elle est adaptée à la conception d'aliments pour des populations présentant des déficiences orales (difficultés masticatoires, syndrome de dysphagie, situation de handicap...) (Godoi et al., 2016 ; Portanguen et al., 2019). Toutefois, selon Jiang, Zheng, Zou, Tong, Han & Wang (2019), il est difficile de l'utiliser, sans ajout d'additif, comme base pour les procédés d'I3D, afin de personnaliser les aliments destinés à ces populations. La gélatine est facilement digestible (Duconseille, Astruc, Quintana, Meersman & Santé-Lhoutellier, 2015), mais ne contient pas de tryptophane, un acide aminé essentiel (**Tableau 2.2**). Il n'est donc pas intéressant d'un point de vue nutritionnel d'utiliser de grandes quantités de gélatine pour texturer les aliments. La glycation pourrait être un moyen d'améliorer les propriétés fonctionnelles de la gélatine, tout en limitant sa proportion dans l'aliment au profit de protéines de meilleure qualité pour un impact nutritionnel supérieur. La gélatine est un biopolymère d'origine animale obtenu par dénaturation thermique ou hydrolyse partielle du collagène, avec un poids moléculaire allant de 15 à 400 kDa (Zhou, Mulvaney & Regenstein, 2006). Elle est composée de collagène dénaturé, mais contient également d'autres molécules en faible quantité (lipides et glucides), ainsi que des ions co-extraits avec le collagène des organes utilisés (peau, os). Sa composition globale dépend de l'espèce animale, de la source de l'organe, du prétraitement et du processus d'extraction, mais la composition en acides aminés est la même que celle du collagène. La gélatine est principalement obtenue à partir de la peau, des os, des tendons d'origine porcine, bovine ou de volaille, ainsi que des arêtes et des écailles de poisson. Sa fabrication se fait par extraction du

collagène animal et se déroule suivant trois grandes étapes. Tout d'abord, le prétraitement permet de retirer une majorité d'éléments non collagéniques, tels que les autres protéines, les graisses ou les minéraux. Ensuite, vient l'extraction du collagène partiellement purifié pour en faire de la gélatine. Pour cela, de l'eau à haute température, avec un pH adapté, est utilisée. Finalement, une étape de clarification/séchage est nécessaire. Il est possible de retrouver également des étapes supplémentaires comme de l'évaporation, de la stérilisation et de la désodorisation (seulement pour les gélatines à base de poisson). A préciser qu'il existe deux types de gélatine : celle de type A et celle de type B. Ces dernières sont obtenues en fonction du pH utilisé lors de l'étape d'extraction, acide ou basique. Cela leur confère des propriétés physico-chimiques différentes et notamment un point isoélectrique qui est, respectivement, de 6,0 – 9,0 ou 4,8 - 5,2 (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2019).

Tableau 2.2. *Composition en acides aminés de la gélatine de type A extraite de peau de porc (en g de résidus d'acides aminés/100 g protéines) (d'après Eysturskarð, Haug, Elharfaoui, Djabourov & Draget, 2009).*

Acides aminés	Masse (g)	Acides aminés	Masse (g)
Alanine	8,3	Leucine	2,9
Arginine	8,5	Lysine	4,0
Aspartate	6,0	Methionine	1,1
Cysteine	0,2	Phenylalanine	2,1
Glutamate	10,5	Proline	13,4
Glycine	20,2	Serine	3,6
Histidine	0,8	Threonine	1,9
Hydroxylysine	1,2	Tyrosine	0,8
Hydroxyproline	10,8	Valine	2,4
Isoleucine	1,3		

Les gélatines sont caractérisées par leur indice Bloom. Cet indice, qui représente la force du gel, a une relation directe avec le poids moléculaire de la gélatine (Netter, Goudoulas, & Germann, 2020 ; Yang et al., 2022). Plus l'indice Bloom augmente, plus le poids moléculaire augmente. L'indice Bloom est un nombre entier, généralement compris entre 50 et 300, associé à chaque gélatine et, qui permet de mesurer sa résistance à l'enfoncement. Il ne s'applique pas uniquement à la gélatine, mais à tout type de gel et possède une définition bien précise : *le degré Bloom mesure la force à appliquer à un cylindre de 12,5 mm de diamètre pour qu'il s'enfonce de 4 mm dans une solution concentrée à 6,67 % dans l'eau pure et, stockée à 10 °C pendant 16 à 18 h*. La mesure de l'indice Bloom est définie selon la norme BS 757 : 1975 « *Methods for sampling and testing gelatines (physical and chemical methods)* » provenant de la *British Standards Institution* (BSI) spécialisée dans la normalisation, la certification, la formation et le contrôle de conformité.

L'indice Bloom est fixé pendant le procédé d'extraction de la gélatine. Selon Portier (2016) et

Netter et al. (2020), ce procédé, pour la gélatine de type A, consiste à faire tremper des peaux d'animaux dans différents bains acides successifs, de températures croissantes comprises entre 55 et 100 °C. Ces conditions conduisent à une hydrolyse partielle du collagène. La gélatine extraite à 55 °C contient les chaînes protéiques les plus longues qui donneront les gels les plus résistants (indice Bloom élevé). L'indice Bloom désiré est ensuite obtenu par mélange des différentes fractions d'extraction.

Lors du traitement thermique, le collagène se dénature et se solubilise dans l'eau d'extraction. Il perd la conformation de ses fibres et se dénature de manière irréversible, car les liaisons covalentes entre les chaînes, les liaisons hydrogène qui stabilisent la triple-hélice et même certaines liaisons peptidiques de la structure primaire, sont rompues. La structure en triple-hélice n'est que partiellement retrouvée lors du refroidissement, de même que les liaisons de type hydrogène qui stabilisent ces structures (Eysturskarð et al., 2009). Les chaînes forment alors des domaines en triple-hélice séparés par des zones où les chaînes sont désorganisées et se retrouvent sous la forme de pelote statistique[13]. Le réseau de protéines qui en résulte piège les molécules d'eau pour former un gel (Duconseille et al., 2015). L'étape d'hydrolyse, acide ou basique, selon s'il s'agit de collagène issu de peau ou d'os (gélatine de type A ou B), est également à l'origine d'une hydrolyse des chaînes-α du collagène qui conduit à la formation de petits peptides (Duconseille et al., 2015). Guo, Colby, Lusignan & Whitesides (2003) ont étudié la cinétique de formation de ces structures dans de la gélatine issue d'os. D'après ces auteurs, la formation de triple-hélices se déroule en deux étapes : la nucléation, qui consiste en la formation d'un *nucleus* fait de deux chaînes-α s'enroulant ensemble pour former une double hélice, puis l'enroulement, étape durant laquelle une troisième chaîne-α s'enroule autour du *nucleus* pour former une triple-hélice (**Figure 2.5**). Les hélices de gélatine ainsi formées sont stabilisées par des liaisons hydrogène intra- et interchaînes, directement entre deux acides aminés ou entre deux acides aminés séparés par une molécule d'eau (**Figure 2.6**).

[13] Une pelote statistique, ou aléatoire, est une conformation d'un polymère dans laquelle les unités monomères sont orientées de façon aléatoire, en étant néanmoins liées aux unités adjacentes. Il ne s'agit pas d'une forme précise, mais d'une répartition statistique de formes pour toutes les chaînes dans une population de macromolécules.

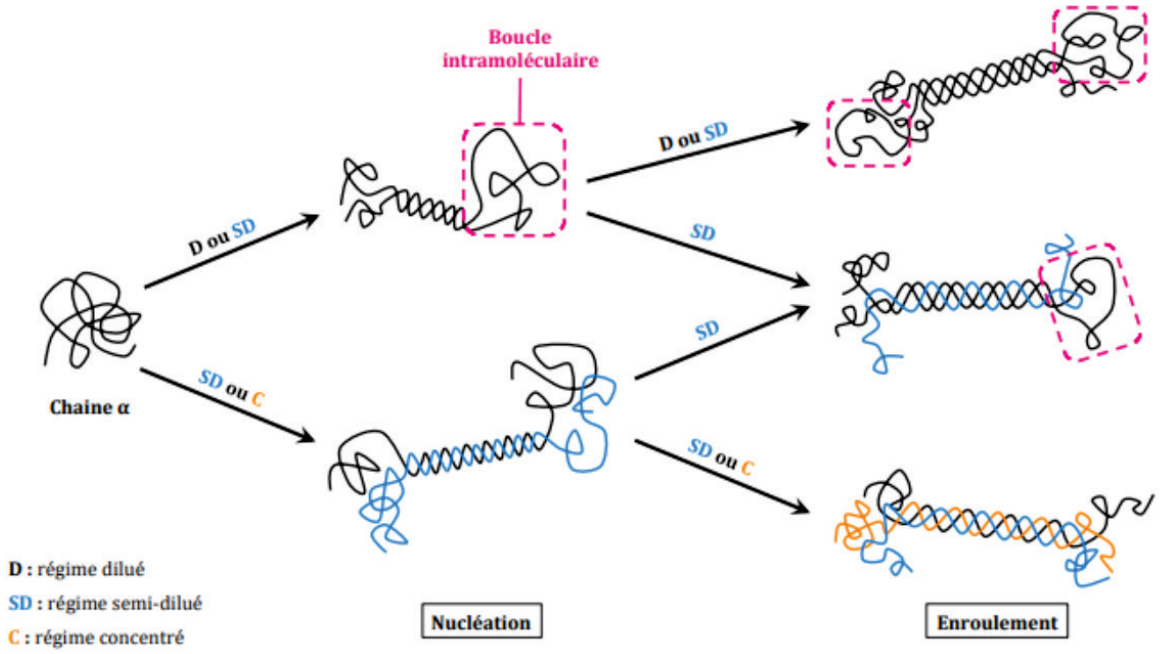


Figure 2.5. *Les différentes voies de formation des triple-hélices au sein de la gélatine (selon Portier (2016).*

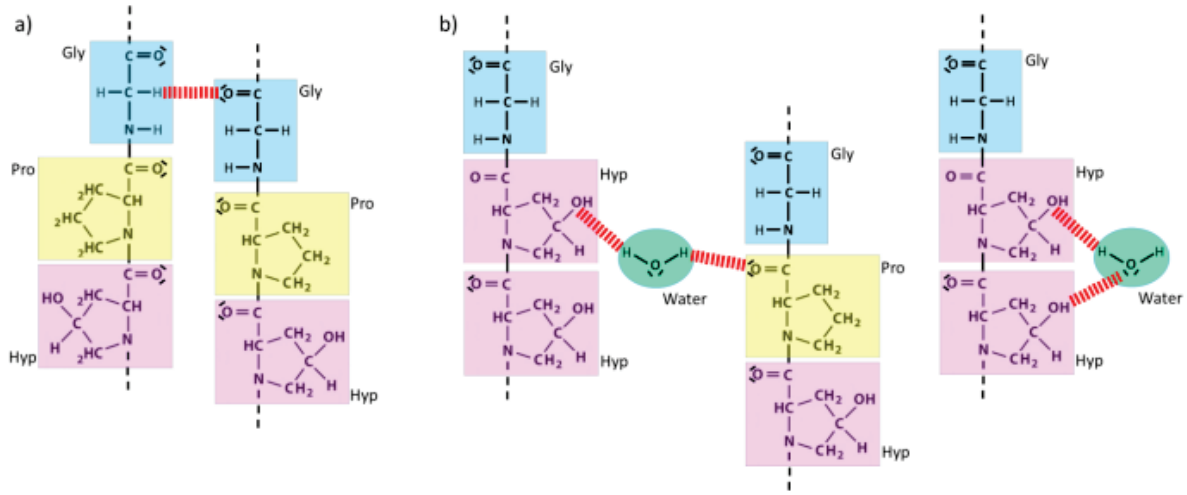


Figure 2.6. *Exemples de liaisons hydrogène (en rouge) dans les chaînes de gélatine (a) et entre les chaînes de gélatine et les molécules d'eau (b) (d'après Duconseille et al., 2015).*

Selon Kozlov & Burdygina (1983), l'humidité est un paramètre majeur qui peut influencer cette structure, à deux niveaux : lorsque la gélatine est sous forme sèche (poudre, granulés ou feuilles) et lorsqu'elle est sous forme de gel. Sous la forme d'un gel, l'eau peut interagir de plusieurs manières : 1) en se plaçant à l'intérieur des hélices pour les stabiliser par formation de liaisons hydrogène, 2) en stabilisant les triple-hélices par l'extérieur en formant des liaisons hydrogène avec les groupes polaires des chaînes de gélatine, et 3) en formant des couches dites "polymoléculaires" qui correspondent à

plusieurs épaisseurs de couches d'eau superposées. Concernant la gélatine en poudre, Kozlov & Burdygina (1983) ont montré que plus la gélatine contenait d'hélices, plus elle était capable d'absorber l'eau de l'air ambiant. Il existe peu d'informations dans la littérature sur la structure de la gélatine et ses interactions avec l'eau, mais c'est sous sa forme en poudre qu'elle est la plus difficile à contrôler, car elle est potentiellement soumise à des variations des conditions environnementales lors du stockage et/ou de l'utilisation. Il est communément admis que la gélatine en poudre se présente sous une forme semi-cristalline, c'est-à-dire qu'elle contient à la fois une phase amorphe, constituée de chaînes de gélatine non enroulées et, une phase cristalline dans laquelle les triple-hélices de gélatine sont présentes seules ou assemblées en faisceaux (Duconseille, Traikia et al., 2017). L'humidité de la gélatine influencerait alors sa structure en raison des interactions avec l'eau (Duconseille, Traikia, et al., 2017). Selon Levine & Slade (1988), l'eau agit comme un plastifiant dans les régions amorphes de la poudre de gélatine, conduisant à une plus grande mobilité des chaînes protéiques et à une interaction avec la phase cristalline. L'humidité de l'air, combinée à la température ambiante, peut donc exercer une influence sur la structure et la mobilité de l'eau dans la poudre.

Les travaux de Duconseille, Wien, et al. (2017), portant sur des gélatines (type A) en poudre contenant 12 % d'humidité, vieillies pendant 4 semaines dans des chambres climatiques à 50 °C et 80 % d'humidité ambiante, ont montré que le vieillissement de la gélatine engendrait une diminution de la structure cristalline de la poudre, qui se traduisait par une diminution de la quantité de triple-hélices due à leur déroulement. Il a également été montré que la mobilité de l'eau augmentait suite à ce vieillissement, ce qui serait dû soit à l'absorption d'eau par la matrice, soit à un relargage d'eau dans la phase amorphe suite à la perte d'une partie de la structure cristalline de la gélatine. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'humidité de la gélatine, quand elle est sous forme de poudre, est dépendante des conditions d'utilisation ou de stockage et, que cette humidité a un impact réel sur la structure de la gélatine et potentiellement sur les propriétés liées à la réaction de glycation, en modifiant les structures tertiaire et secondaire des protéines.

2.1.4.2. Réaction de glycation au sein de la gélatine

Des travaux antérieurs ont déjà montré que la réaction de glycation avait lieu dans la gélatine de poisson en présence de lactose (Etxabide, Urdanpilleta, Gómez-Arriaran, de la Caba, & Guerrero, 2017). La réticulation induite par la glycation est dépendante de la concentration en lactose et du pH réactionnel (favorisée à pH 10) et, la couleur du gel (jaune) est considérée comme un marqueur de progression de la réaction. Des changements au niveau de la structure macromoléculaire ont

également été mis en évidence (bande spectrale infrarouge des amides II) en fonction de ces conditions réactionnelles. Schmidt et al. (2017) ont observé des modifications au niveau de l'amide I et de la bande attribuée aux glucides (1100-900 cm^{-1}) pour du collagène issu d'os. Ceci a été confirmé par Vaez et al. (2023) qui ont observé une augmentation de l'amplitude dans la bande 1080-1031 cm^{-1} dans le cas du collagène. D'après ces auteurs, ceci pourrait être attribué à l'accumulation de produits de glycation.

A notre connaissance, aucune étude n'a investigué l'effet de la teneur en eau initiale de la gélatine, comme facteur susceptible d'influencer la réaction de glycation.

Le choix de l'ose réducteur est important pour le déroulement de la réaction. Les glucides sont des molécules organiques comportant un groupe carbonyle et au moins deux groupes hydroxyles. Les oses sont très variés et possèdent une terminologie bien précise en fonction de leur nombre de carbones (de 3 à 9), de leur groupe carbonyle (cétose ou aldéhyde) et de leur structure (cyclique ou acyclique). Lorsque l'ose possède une fonction aldéhyde (aldose) dans sa forme linéaire, ou est capable d'en former une par isomérie (cas de certains cétoses comme le fructose), il est qualifié de « glucide réducteur ». Ce dernier peut alors agir comme un réducteur et s'associer aux fonctions amines des protéines. Dans la littérature, les oses réducteurs les plus utilisés sont le ribose, le lactose, le fructose et le glucose. Il est également possible de trouver certaines études utilisant de l'arabinose, du galactose ou encore du rhamnose (**Figure 2.7**).

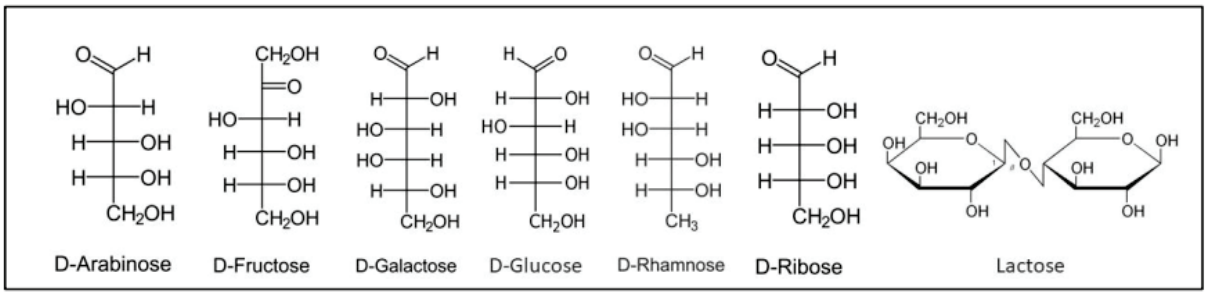


Figure 2.7. *Principaux glucides réducteurs utilisés pour initier la réaction de glycation dans des matrices alimentaires.*

L'impact de ces glucides sur la résistance de la matrice alimentaire est variable et, d'après Chevalier, Chobert, Popineau, Nicolas & Haertlé (2001), il semblerait que le *D*-ribose soit le plus réactif d'entre eux, suivi de l'arabinose, du galactose, du glucose, du rhamnose et du lactose. En déterminant

la proportion de fonctions amines modifiées dans la protéine après chauffage avec un de ces glucides, il apparait que le degré de modification est en relation directe avec la taille de celui-ci et, plus particulièrement, avec la longueur de sa chaîne carbonée. Plus celle-ci est courte, plus le glucide est de forme linéaire, permettant ainsi une meilleure réactivité avec la protéine. En effet, l'ose n'est pas réducteur lorsqu'il est sous une forme cyclique. Les pentoses sont donc plus adaptés que les hexoses. Le ribose étant 20 fois plus réactif avec les protéines que ne le serait le glucose (Jaisson & Gillery, 2018), il était naturel de l'utiliser dans nos travaux expérimentaux sur la glycation.

2.1.5. Modélisation de la réaction de glycation et processus d'impression 3D pour les aliments personnalisés texturés

La conception d'un aliment fonctionnel est complexe. Elle peut nécessiter l'analyse de critères liés à la nutrition, aux propriétés mécaniques, à la géométrie ou à la cinétique réactionnelle. La modélisation est un outil précieux pour évaluer simultanément plusieurs facteurs et tester rapidement un grand nombre de conditions de formulation ou de procédé, mais est actuellement sous-utilisée.

Les modèles de cinétique chimique décrivent le mécanisme en détail ou, en l'absence d'informations sur le processus, décrivent au moins les principales caractéristiques du schéma réactionnel. Ce deuxième type de modèle cinétique existe dans le cas de la réaction de glycation (Zhan et al., 2020).

Ces modèles cinétiques résolvent un ensemble d'équations différentielles représentant les voies réactionnelles proposées, plus ou moins complexes, pour lesquelles les constantes de vitesse sont estimées à partir de la littérature existante et des données expérimentales. Lorsque plusieurs températures sont étudiées, l'énergie d'activation est estimée de la même manière que la constante de vitesse. La connaissance de la concentration initiale des réactifs (qui comprennent entre autres le glucose, le fructose et les acides aminés libres) est ensuite utilisée pour prédire l'évolution temporelle des concentrations d'AGEs, tels que la furosine, la pyrraline, le méthylglyoxal et la 3-désoxyglucosone (Li & Yu, 2018). Ces auteurs ont décrit en détail les voies de formation de la pentosidine et de la pyrraline, via les α-oxoaldéhydes et la réaction de glycation.

Les schémas réactionnels se veulent génériques, ils sont néanmoins non exhaustifs et ne fournissent donc une valeur prédictive que lorsqu'aucun composé matriciel influent n'est absent du schéma réactionnel modélisé et, que leurs interactions ne sont pas limitées par des frontières structurelles non prises en compte. Néanmoins, cette approche basée sur les réactions est robuste

aux changements de concentrations initiales, ce qui rend les modèles résultants raisonnablement applicables à une large gamme de compositions de produits et adaptés à l'aide à la formulation. La cinétique des agents thérapeutiques affectant les AGEs (Thornalley, Yurek-George & Argirov, 2000) pourrait également être incluse. Cette modélisation permet de comprendre en détail les voies réactionnelles. Les réactions clés et les paramètres importants sont identifiés : cela permet à la fois d'optimiser la conception des expériences et de quantifier avec précision les AGEs ciblés.

En raison de l'implication des AGEs dans la physiopathologie, des études de *docking*[14] moléculaire et de simulation ont également été menées sur le pouvoir anti-glycation des additifs affectant les protéines humaines sensibles aux réactions glycémiques. C'est notamment le cas pour l'albumine sérique humaine (Asyari, Kurniawati & Aminin, 2019) et pour le collagène de type I. Ce dernier est particulièrement sujet à la réticulation des AGEs, ce qui nuit à sa fonctionnalité (Collier, Nash, Birch & de Leeuw, 2016). Une approche similaire pourrait être utilisée pour l'évaluation des additifs utilisés pour la texture ou la sécurité chimique des aliments.

En conclusion, les approches de modélisation peuvent prédire la quantité d'AGEs produite dans le cas de diverses formulations et conditions environnementales, et peuvent donc être utilisées pour optimiser la réduction des AGEs dans les processus.

2.1.6. Les méthodes d'étude et de suivi de la réaction de glycation

Depuis les années 1980, diverses méthodes analytiques ont été utilisées pour quantifier le degré de réticulation engendré par la réaction, certaines sont indirectes quand d'autres peuvent cibler un produit de la réaction ou des modifications de la (micro)structure de la matrice. Le **Tableau 2.3** en fait la synthèse. Les principales méthodes utilisées dans ce travail de thèse sont décrites ensuite.

[14] *Docking*, ou "amarrage moléculaire" : approche numérique de modélisation moléculaire. Ceci consiste à identifier la meilleure orientation entre 2 molécules sur la base de leurs coordonnées dans des états pris séparément.

Tableau 2.3. *Méthodes analytiques complémentaires, utilisables pour le suivi de la réaction de glycation.*

Méthodes	Paramètres mesurés	Références (exemples)
Dosage des glucides	Oses réducteurs libres (*vs*. oses impliqués dans des liaisons covalentes)	/
Colorimétrie	L* a* b* (formation de composés bruns)	Etxabide et al. (2017) Stevenson et al. (2020)
Analyse du profil de texture	Fermeté, adhésion, cohésion, élasticité, masticabilité	Matsudomi et al. (2002) Sun et al. (2004) Liu et al. (2017)
Rhéologie	Impact sur la microstructure de la matrice : modules élastique et visqueux, taux de cisaillement, viscosité	Fu et al. (2019) Abuibaid et al. (2020)
Microscopie (électronique à balayage, à force atomique)	Organisation ultra-structurale : mise en évidence de structures fibrillaires	Wang et al., 2020) Etxabide et al. (2015)
Densitométrie (SDS-Page)	Poids moléculaire des protéines : apparition de produits de glycation	Liu, Sakai, & Taya (2012)
Spectrométrie de masse	Formation de bases de Schiff, AGEs	Sharma et al. (2015) Sun et al. (2021)
Spectrophotométrie UV-visible	Formation d'intermédiaires réactionnels	Stevenson et al. (2020)
Spectroscopie infrarouge	Impact de la glycation sur la structure chimique : vibrations liaisons moléculaires	Coopman et al. (2017) Etxabide et al. 2022)
Fluorescence	Formation d'AGEs	Bandiwadekar et al. (2023)
Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	Formation d'AGEs	Degen et al. (2012)

2.1.6.1. Dosage des glucides réducteurs

Plusieurs auteurs mentionnent, dans leurs travaux, une étape de dialyse soit pour récupérer certains produits de la glycation comme les mélanoïdines (Benzing-Purdie, 1985), soit les glucides réducteurs sous forme libre (Syrovy, 1994). Les modes opératoires utilisés sont peu détaillés, seules quelques informations sont disponibles comme le seuil de coupure à 12 kDa pour les mélanoïdines et l'utilisation d'une solution tampon à pH physiologique pour les glucides. Comme les mélanoïdines ne représentent qu'une partie des produits de la glycation et qu'elles apparaissent au stade final de la réaction qui n'est pas toujours atteint en fonction des conditions expérimentales, la méthode de Benzing-Purdie (1985) ne paraît donc pas la mieux adaptée pour le suivi quantitatif de la réaction. Il est, en revanche, possible d'envisager de reprendre la méthode de Syrovy (1994) pour extraire les riboses sous forme libre, qui n'ont pas réagi avec les protéines, avant de les doser par la méthode de Dubois Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956). Cela permet d'évaluer la quantité de glucide réducteur qui s'est liée aux protéines lors de la réaction. Le principal problème de cette méthode consiste à récupérer, lors de l'étape de dialyse, l'ensemble des oses libres. Cette étape est délicate et va dépendre de l'équilibre ionique, mais également de la matrice. La structure d'une matrice solide ou visqueuse limitera la diffusion des molécules.

2.1.6.2. Méthodes colorimétriques

Les méthodes colorimétriques se composent de 2 approches :

- La mesure de la couleur de l'échantillon dans un espace de couleur défini ;
- L'utilisation des propriétés d'absorption de la matrice à des longueurs d'onde spécifiques.

Stevenson et al. (2020) se basent sur le fait que la formation de mélanoïdines (stade avancé de la glycation) s'accompagne d'un changement de couleur caractéristique de l'échantillon (brunissement). Cette méthode consiste donc à effectuer, la plus souvent, des mesures dans l'espace de couleur CIELAB, afin de calculer l'écart de couleur ΔE* et l'indice de brunissement (BI). Une augmentation des valeurs de ces deux paramètres conduit les auteurs à conclure que, si le brunissement augmente, le taux de réticulation augmente également.

Même si les études utilisant ces méthodes colorimétriques sont relativement peu répandues, certains composés d'intérêt peuvent tout de même être dosés. Citons les travaux de Tanaka, Avigad, Brodsky & Eikenberry (1988) qui ont évalué la quantité de glucides liés aux protéines, en dosant le formaldéhyde par spectrophotométrie, à la suite d'une réaction d'oxydation avec le périodate de sodium. Une mole de monosaccharide lié permettant de former deux moles de formaldéhyde.

Fu et al. (2019) ; Wang et al. (2020) et Stevenson et al. (2020) ont suivi la progression de la réaction de glycation à des longueurs d'ondes de 294 et 420 nm, afin d'analyser l'extension de la réticulation en fonction des conditions réactionnelles. Stevenson et al. (2020) ont suivi l'avancement de la réaction de glycation entre du *D*-ribose et de la gélatine de poisson, en fonction de la température réactionnelle (température ambiante, 70 °C et 90 °C), du temps de chauffage (de 0 à 1440 min) et de la concentration en gélatine (2,5 ; 3,5 et 5 g pour 100 mL d'eau). La comparaison des spectres d'absorption, obtenus à différents temps, montre que les valeurs d'absorbance ont tendance à augmenter avec le temps de chauffage, quelle que soit la température, ce qui témoigne de la formation de produits de la réaction de glycation, mais que cette augmentation est indépendante de la concentration en gélatine. Il a notamment été constaté une augmentation de l'absorbance à 294 nm, qui serait due à la formation de composés incolores lors de la phase précoce de la glycation. La formation de mélanoïdines est caractérisée par un pic d'absorbance à 420 nm. Ce dernier était très faible sur le spectre de la réaction ayant eu lieu à 70 °C, mais était beaucoup plus marqué sur celui à 90 °C. Les mélanoïdines se formant lors de l'étape finale de la réaction de Maillard, leur présence indique que la réaction de glycation a atteint un stage avancé, produisant des composés indésirables.

Francis-Sedlak, Uriel, Larson, Greisler, Venerus & Brey (2009) ont également mesuré le degré ou l'étendue de la réticulation par une méthode spectrophotométrique, mais avec une approche différente. Ces auteurs ont quantifié la consommation de fonctions amines impliquées dans des liaisons avec le glucose-6-phosphate (G6P - glucide utilisé dans l'étude pour des raisons cliniques). Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation de l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique, qui forme un complexe coloré avec l'azote α-aminé (Chacornac, Barnouin & Houlier, 1992).

2.1.6.3. Méthode par fluorescence

Une méthode complémentaire à celle proposée par Fu et al. (2019), présentée précédemment, se base sur la fluorescence du tryptophane (longueur d'excitation et d'émission de 295 et 300-500 nm, respectivement). Plus cette fluorescence est de faible intensité, plus le degré de glycation est élevé. D'après ces auteurs, ceci ne semble pas dû à une liaison entre les résidus de tryptophane et les glucides présents, mais plutôt à des modifications structurelles induites par la glycation. Cependant, cette méthode n'est pas applicable à la gélatine, qui ne contient pas de tryptophane (**Tableau 2.2**). Les travaux de Bandiwadekar et al. (2023) montrent néanmoins qu'il est possible de suivre certains AGEs en tant qu'indicateur de la glycation. En effet, des produits de réticulation comme la crossline ou la pentosidine sont naturellement fluorescents.

2.1.6.4. Profil de texture et rhéologie

Les méthodes mécaniques sont communément utilisées pour caractériser l'effet d'une transformation ou d'un procédé sur une matrice alimentaire. Dans le cas de la glycation et de l'apparition supposée de liaisons covalentes, des variations de force directement en relation avec l'évolution de la microstructure interne de la matrice sont attendues. Ces mesures revêtent une double importance car elles permettent :

- D'évaluer les propriétés de fermeté ou de masticabilité de la matrice glyquée (texture) ;
- D'évaluer l'imprimabilité de la matrice alimentaire par I3D (*i.e.* son comportement rhéologique).

Pour caractériser la texture de matrices alimentaires, la méthode de *Texture Profile Analysis* (TPA) est fréquemment utilisée. Cette méthode consiste à appliquer un double cycle de compression pour simuler une action de mastication (**Figure 2.8**). La force nécessaire à cette déformation est

mesurée tout au long du cycle et permet de déterminer différents paramètres relatifs au produit : la fermeté, l'élasticité, l'adhérence, la cohésion et la masticabilité. Ces paramètres servent à objectiver les propriétés sensorielles de la matrice alimentaire ressenties par le consommateur (**Tableau 2.4**).

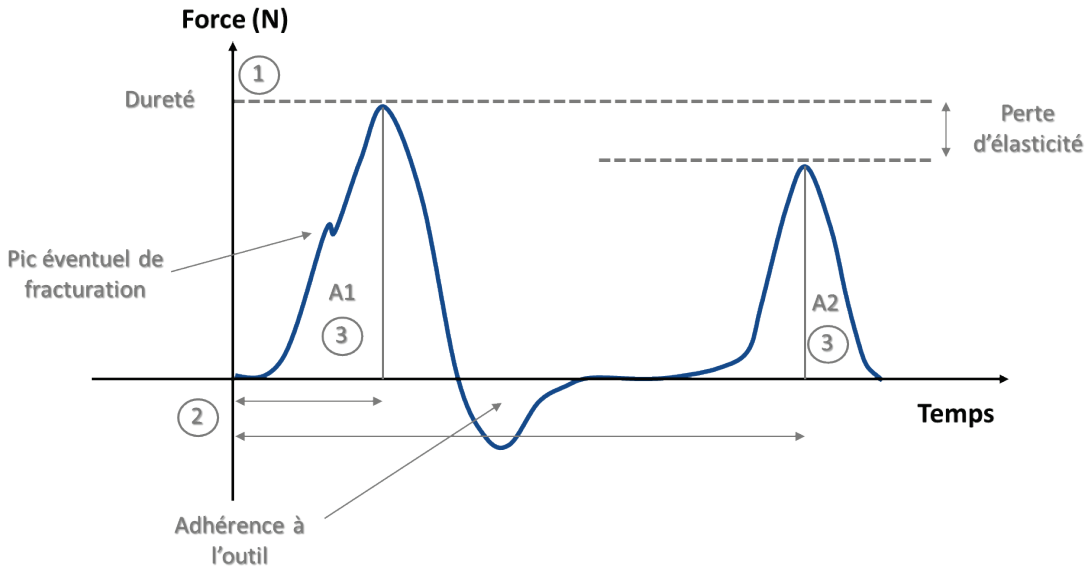


Figure 2.8. *Courbe théorique d'une mesure de TPA correspondant à deux compressions successives de l'échantillon analysé. A1 et A2 : aires sous les courbes ; 1) Dureté = force maximale ; 2) Elasticité = temps de contact outil/échantillon ; 3) rapport de surface entre les 2 pics.*

Tableau 2.4. *Définition mécanique et signification physiologique des 5 paramètres mesurés par TPA.*

Paramètres mesurés	Définition mécanique	Définition physiologique
Fermeté (N)	Force nécessaire à appliquer sur un produit pour qu'il atteigne une certaine déformation.	Force nécessaire pour comprimer un solide entre les molaires.
Elasticité	Vitesse à laquelle un produit déformé retrouve sa forme initiale après la disparition de la force de déformation qui lui était appliquée.	A quel point un produit retrouve sa forme originale une fois qu'il a été comprimé entre les dents.
Adhérence (J)	Travail nécessaire pour vaincre les forces d'attraction entre la surface du produit et celles des outils.	Force requise pour ouvrir la mâchoire après avoir mordu dans l'échantillon.
Cohésion	Point jusqu'auquel le produit peut être déformé avant de se rompre.	Degré de compression du produit entre les molaires avant qu'il ne se rompe.
Masticabilité (N)	Energie requise pour mastiquer un solide et l'amener à un état qui lui permette d'être avalé.	Durée nécessaire à la mastication de l'échantillon pour l'amener à un état qui lui permette d'être avalé.

L'analyse du comportement rhéologique de matrices ayant subi des réticulations est également une approche utilisée dans un grand nombre d'études. Des modifications des propriétés mécaniques peuvent apparaître et peuvent être mesurées. Ceci a notamment été montré par Francis-Sedlak et al. (2009). A l'aide d'un rhéomètre, des changements de propriétés de gels de collagène, dus à l'augmentation de la concentration en G6P, ont pu être mis en évidence. En effet, les valeurs des modules de stockage (G') et de perte (G'') d'un gel glyqué avec 375 mM de G6P étaient significativement plus élevées que celles du contrôle. De telles variations dans les valeurs de ces modules pourraient s'expliquer par des différences de quantité d'eau liée aux protéines en fonction du degré de glycation (Fu et al., 2019). Ces études ont donc montré la pertinence des mesures rhéologiques pour évaluer les propriétés de gels de protéines et, en particulier, de collagène incubé avec un ose réducteur. Les travaux de Wang et al. (2020) viennent également confirmer que la glycation a un effet sur la variation du module G' (lié à l'élasticité de la gélification), qui se traduit par une augmentation exponentielle du module. Selon ces auteurs, ceci peut être dû à l'augmentation des interactions hydrophobes entre les protéines et les glucides (isomalto-oligosaccharide protéines de blanc d'œuf) pendant la formation du gel, ou/et à un renforcement de la structure du réseau du gel protéique par des liaisons hydrogène intermoléculaires, lors de la phase de refroidissement.

Les propriétés mécaniques des matrices alimentaires glyquées sont discutées dans les sections 2.3.2.5 et 2.3.2.6, en rapport avec la littérature scientifique du domaine. Des explications plus précises concernant les propriétés rhéologiques seront également apportées dans le **Chapitre 3**, cette fois sur des matrices alimentaires non-glyquées.

2.1.6.5. Analyses microscopiques

D'après Liu et al. (2017), les propriétés mécaniques et physiques des protéines sont étroitement liées à leurs caractéristiques microstructurales, qui dépendent fortement de la formulation et du procédé de fabrication.

Comme décrit ci-après, la majorité des études publiées sur la glycation de matrices alimentaires utilise la Microscopie Electronique à Balayage (MEB), c'est-à-dire des observations en haute résolution de la surface des échantillons. Néanmoins, d'autres méthodes peuvent être utilisées, comme la microscopie à force atomique qui a permis à Etxabide et al. (2015) d'observer des structures hétérogènes qualifiées de « fibrillaires », semblables aux structures en triple-hélice présentes dans la gélatine de poisson glyquée (*cf*. 2.3.2.3).

Liu et al. (2017), dont les travaux portaient sur la glycation d'isolat de protéines de cacahuètes

avec du xylose, ont observé, par MEB, que les films à base de protéines et de glucides avaient une structure plus dense que ceux à base de protéines seules. Après 3 jours de glycation, les films présentaient une structure plus compacte et plus lisse qu'avant la réaction. Ces auteurs ont également observé une densification progressive de la structure des gels avec l'augmentation de la concentration en xylose, jusqu'à l'obtention, pour une concentration de 10 %, d'une structure plus dense et moins hétérogène que dans les gels de concentration inférieure. Les auteurs ont attribué l'amélioration de la résistance à la traction des films formés, à base de ces conjugués protéines/glucides, à ces changements ultra-structuraux, eux-mêmes ayant été provoqués par des interactions moléculaires covalentes ou non-covalentes.

Sur une période de deux ans, Wang et al. (2018 ; 2020) ont montré, sur des protéines de blanc d'œuf, l'effet de la glycation par MEB, à savoir :

- La formation de petits agrégats, dont le diamètre diminuait avec le degré de glycation des protéines. Ceux-ci pourraient prendre part à la formation d'un réseau tridimensionnel plus dense, ce qui expliquerait les observations microscopiques ;
- La mise en évidence d'un réseau plus fin, dense et uniforme pour les gels glyqués par rapport à des gels ne contenant que des protéines, ou un mélange protéines/glucides n'ayant pas été soumis à des conditions de glycation (chauffage à 60 °C pendant 72 h) (**Figure 2.9**).

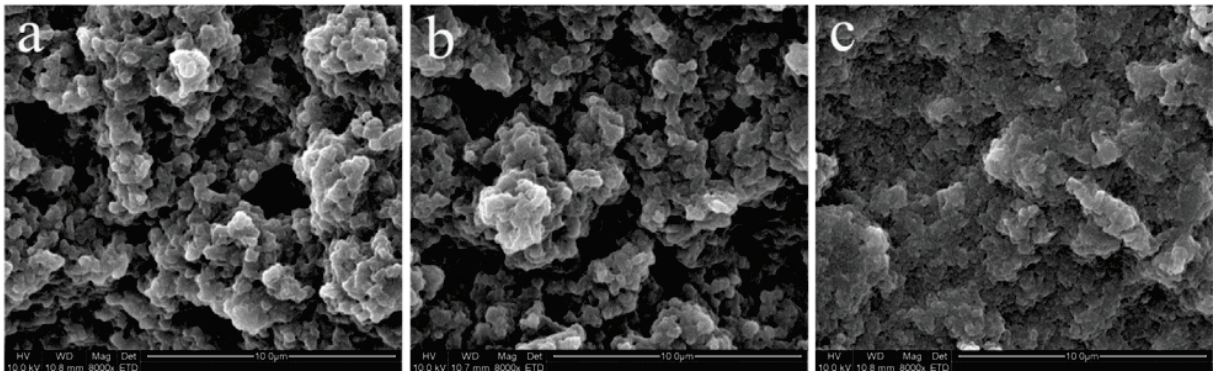


Figure 2.9. *Observations en Microscopie Electronique à Balayage (grossissement : x8000) de : A – protéines de blanc d'œuf natives (absence de glucides) ; B – en présence de glucides avec un ratio de 1 :10 (isomalto-oligosaccharide), mais sans chauffage ; C – de protéines et d'isomalto-oligosaccharide avec un ratio de 1 :10, chauffés pendant 72 h à 60 °C (d'après Wang et al., 2020).*

Par rapport aux matrices précédentes, la gélatine semble être une matrice plus complexe. En effet, lors de leurs observations, Stevenson, Long, Guerrero, de la Caba, Seyfoddin & Etxabide (2019) ont mis en évidence une structure plus uniforme, mais également plus poreuse de gels de gélatine

glyqués, ce qui est en contraction avec les observations de Wang et al. (2020) où un réseau plus dense apparaissait après glycation.

2.1.6.6. Densitométrie

Si la réalisation d'électrophorèses en condition SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est généralement utilisée pour un suivi qualitatif de l'avancement de la glycation, en observant l'apparition de différents produits de la glycation caractérisés par leur poids moléculaire plus importants Liu et al. (2012), plusieurs travaux mentionnent le suivi quantitatif de cette réaction grâce à l'analyse densitométrique de ces gels, à l'aide de logiciels d'analyse d'image. Pour quantifier une protéine inconnue, Villela et al. (2020) ont utilisé différents standards protéiques de concentration connue (sérum albumine bovine, anhydrase carbonique, ovalbumine et marqueurs de poids moléculaire). La protéine à quantifier, un anticorps à domaine unique, avait un poids moléculaire estimé à environ 31 kDa. Après électrophorèse sur gel SDS-PAGE, avec coloration au bleu de Coomassie et traitement de l'image obtenue, la charge en protéines présente, pour chaque marqueur, était corrélée à l'aire du pic correspondant sur le profil de densitométrie. Cela a permis d'en déduire la concentration en protéine inconnue de leur échantillon. Il a également été constaté qu'une charge protéique trop importante saturait les profils de densité. La technologie de fluorescence Stain-Free™ des laboratoires Bio-Rad est également évoquée dans cette étude pour la quantification des protéines. Elle consiste en l'utilisation d'un gel de polyacrylamide contenant un composé qui se fixe aux résidus de tryptophane de la protéine étudiée et accentue sa fluorescence lorsqu'elle est exposée aux rayonnements UV, ce qui permet de détecter des protéines présentes en très faible concentration. Néanmoins, si la technique développée par Villela et al. (2020) peut être envisagée pour quantifier les produits de la glycation, la technologie Stain-Free™ ne semble pas applicable à des matrices de type gélatine, ne contenant pas de tryptophane.

D'importants changements au niveau de protéines laitières, après glycation avec du glucose, ont pu être mis en évidence, par SDS-PAGE (Cucu, De Meulenaer, Kerkaert, Vandenberghe & Devreese, 2012). Une incubation de 48 h a conduit à la formation d'agrégats présentant des masses plus importantes, perturbant ainsi la migration au sein du gel. Étant donné que les expériences par SDS-PAGE ont été réalisées dans des conditions réductrices, l'agrégation de protéines observée ne peut être due à la formation de ponts disulfures. Les auteurs ont associé ce phénomène aux liaisons covalentes formées entre les groupements carbonyles et les résidus α- ou ε-aminés disponibles.

A l'instar des travaux de Villela et al. (2020), les électrophorégrammes sont généralement

pratiqués sur des extraits protéiques purifiés, ce qui permet d'obtenir une bande nette et isolée. Il sera difficile d'obtenir ce genre de résultats sur des échantillons de gélatine glyquée, au vu de la complexité protéique de la matrice. Des résultats préliminaires réalisés dans le cadre de ce travail de thèse (non présentés ici) en attestent, en montrant un nombre important de bandes, difficiles à définir, sur l'ensemble des gélatines non-glyquées utilisées. Si la charge protéique des bandes est trop importante, cela pourrait induire une saturation des profils de densité et, conduire à des résultats non exploitables, comme l'avaient souligné Villela et al. (2020).

2.1.6.7. Spectrométrie de masse

La spectroscopie de masse (MS) est une méthode d'analyse physique utilisée pour identifier des protéines, en mesurant le rapport masse sur charge des peptides ionisés. Un spectromètre de masse est généralement composé de trois éléments : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur.

Plusieurs techniques, en fonction des résultats attendus peuvent être utilisées. La **Figure 2.10** décrit la différence entre les approches Maldi-TOF/MS et MS/MS.

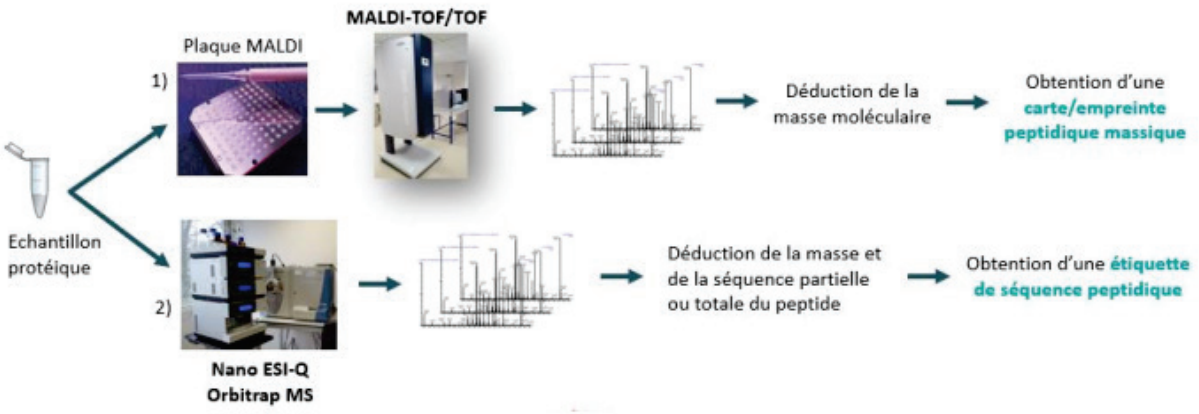


Figure 2.10. *Analyse d'un échantillon protéique par spectrométrie de masse (approches Maldi-TOF/MS en haut et MS/MS en bas).*

Comparativement à la MS (Maldi-TOF/MS), la MS/MS (Orbitrap) permet d'obtenir une étiquette de séquence peptidique, c'est-à-dire une information sur la masse du peptide, mais aussi sur sa séquence partielle ou totale grâce à sa fragmentation. En effet, l'analyseur Quadripôle permet de déduire la masse du peptide parent et, l'Orbitrap (second analyseur) permet de déduire la masse des peptides fils, c'est-à-dire des fragments qui constituaient initialement le peptide parent.

Cucu et al. (2012) ont utilisé les méthodes Maldi-TOF/MS et MS/MS pour identifier des

protéines post-glycation (protéines de lactosérum et glucose). La quantité de groupements carbonyles liés aux protéines ainsi que la perte de résidus réactifs de Lysine a été utilisée comme indicateur du degré de glycation. La perte de résidus de Lysine est depuis longtemps utilisée comme indicateur des stades précoces et avancés de la réaction de glycation (Contreras-Calderon et al., 2009).

Sun et al. (2021), en étudiant la conjugaison entre de l'ovalbumine et du dextrane, ont pu mettre en évidence 12 sites de glycation, suite au couplage de l'approche MS avec l'HPLC. Les résultats obtenus lors de cette étude sont discutés en section 2.3.2.2.3.

2.1.6.8. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La spectroscopie en moyen Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) consiste à mesurer l'absorption de certaines longueurs d'ondes du spectre (IR) par les molécules constitutives d'un échantillon. Les longueurs d'onde (λ) absorbées renseignent sur la nature des liaisons chimiques présentes au sein de ces molécules, car celles-ci convertissent l'énergie issue de ces longueurs d'ondes spécifiques en vibration moléculaire. Les longueurs d'onde mesurées sont exprimées sous forme de nombre d'onde $\overline{\nu}$ (en cm^{-1}) tels que $\overline{\nu} = 1\ \lambda$ (Bruker, 2022 ; Dalibart & Servant, 2000).

La FT-IR permet d'observer des changements dans la structure secondaire des macromolécules, d'acquérir des informations sur la composition de la matrice (lipides, protéines, glucides) et, également d'identifier certaines molécules qui ont une signature spectrale spécifique ; elle a été appliquée, dans notre cas, à la gélatine après glycation. En effet, le spectre IR d'une protéine est caractérisé par la présence de bandes caractéristiques appelées bandes amides. La bande amide I, en particulier, permet d'obtenir des informations sur la composition de la structure secondaire des protéines (présence d'hélices-α et de feuillets-β, coudes, *etc.*). Il est possible de la décomposer en sous-bandes, dont la position et l'aire sont corrélées à la nature et à la quantité des différents types de structures secondaires existantes (Bridelli, Stani & Bedotti, 2017).

Stevenson et al. (2020) ont étudié les modifications chimiques liées à la glycation, et notamment les modifications de la structure secondaire de la gélatine, par l'acquisition de spectres infrarouge entre 4000 et 800 cm^{-1} (méthode également utilisée par Wang et al. (2020) entre 4000 et 400 cm^{-1}). Les vibrations des liaisons Amides I, II et III ont été mises en relation avec les échantillons de gélatine, ce qui a permis de déceler une vibration d'étirement caractéristique d'un cycle pyranose (ex. : ribose). Le pic correspondant à la liaison Amide I a subi un ajustement de courbe afin de réaliser une analyse quantitative des changements de structure de la gélatine, notamment pour les feuillets-β agrégés qui se retrouvent couramment dans les protéines coagulées lors d'une dénaturation thermique. A mesure

que la température augmentait (jusqu'à 90 °C), une conversion des hélices-α vers des feuillets-β était observée, ceci ayant été interprété comme un dépliement de la protéine qui, par conséquent, a entraîné une meilleure accessibilité du ribose et une plus grande extension de la réticulation. Cependant, les travaux de Wang et al. (2020) sur le blanc d'œuf (ovalbumine) ont montré des résultats sensiblement différents. Après avoir considéré que la plage de longueur d'onde allant de 1700 à 1600 cm^{-1} (bande Amide I) était caractéristique de la structure secondaire des protéines, ces auteurs ont montré que la structure du blanc d'œuf natif était dominée par des structures intramoléculaires de type feuillets-β (1630 cm^{-1}), puis par des feuillets-β intermoléculaires (1689 cm^{-1}). Le blanc d'œuf glyqué, quant à lui, présentait une augmentation de la proportion de feuillets-β à la fois intra- et intermoléculaires. Par contre, à la différence des résultats de Stevenson et al. (2020), une diminution du nombre d'hélices-3_{10}[15] a été observée (1640 cm^{-1}), qui s'expliquerait par le traitement thermique (jusqu'à 120 h à 60 °C). Dans le même temps, une augmentation de l'intensité à 1689 cm^{-1} a été observée, reflétant la formation de liaisons hydrogène au niveau des feuillets-β.

Les changements observés par FT-IR sont minimes, ce qui est confirmé par les travaux de Bridelli et al. (2017), voire parfois indétectables, comme l'ont constaté Bhat & Karim (2014) ; il paraît donc difficile de se baser sur leur simple suivi pour évaluer l'état d'avancement de la glycation. Les variations des résultats entre ces différentes études peuvent être liées aux différences entre les paramètres réactionnels de la glycation. Contrairement à Stevenson et al. (2020) et Bridelli et al. (2017) qui travaillaient à un pH proche de 7, Bhat & Karim (2014) n'ont pas mesuré le pH des gels étudiés. Si la réaction s'est déroulée hors de l'intervalle de pH optimal (entre 7 et 9), il est possible que cela explique l'absence de certains produits de la réaction.

De nombreux auteurs ont montré que l'analyse par FT-IR permettait d'observer l'effet de réticulation entre des glucides et le collagène de gélatine sur la structure secondaire de ces protéines. Par exemple, Etxabide et al. (2017) ont mis en évidence des changements au niveau de la bande des Amides II de la gélatine de poisson en présence de lactose. Schmidt et al. (2017) ont observé des modifications au niveau de bande Amide I et de la bande attribuée aux glucides (1100-900 cm^{-1}) pour du collagène issu d'os. Ceci a été confirmé par Vaez et al. (2023) qui ont observé une augmentation de l'amplitude dans la bande 1080-1031 cm^{-1} pour du collagène. D'après ces auteurs, ceci pourrait être attribué à l'accumulation de produits de glycation.

La spectroscopie FT-IR permet aussi de suivre l'accumulation des produits de la glycation dans le

[15] Une hélice-3_{10} est un type de structure secondaire des protéines susceptible de se former aux extrémités des hélices-α ou de manière isolée. Les hélices-3_{10} constituent environ 10 % des domaines hélicoïdaux des protéines globulaires.

gel au cours de la réaction. C'est ce qu'ont fait Bridelli et al. (2017) au cours de leurs travaux sur la glycation du collagène de type I avec le *D*-ribose et le *D*-glucose. En comparant les spectres du collagène, du ribose et du glucose seuls, ils ont pu mettre en évidence l'existence d'une double bande semblant être caractéristique de la réaction du collagène avec un ose réducteur, située dans l'intervalle 1150-950 cm^{-1}, avec 2 pics situés à 1032 et 1080 cm^{-1}. Ils ont ensuite suivi l'évolution de l'amplitude et de l'aire sous la courbe de cette zone au cours du temps. Une augmentation de l'amplitude du double pic a été constatée, qui est fonction de la concentration en ose et du temps d'incubation des réactifs. Il a été considéré que l'aire sous la courbe du pic de l'amide I était un indicateur de la quantité de collagène. Cette aire a été utilisée pour normaliser les aires du pic représentant les glucides pour estimer la quantité de produits de glycation accumulés. La cinétique d'accumulation des produits a ainsi pu être suivie et une relation linéaire a été établie avec la quantité de produits de glycation accumulée et le temps de réaction. De plus, la quantité de produits de glycation formée augmente avec la concentration initiale en ose, bien qu'aucune relation linéaire entre ces paramètres n'ait pu être montrée. Il est également apparu que la cinétique de glycation était plus rapide pour le ribose que pour le glucose, ce qui a déjà été montré dans la littérature, le ribose étant plus réactif que le glucose. Roy et al. (2010) ont couplé ces mesures en FT-IR avec des mesures de fluorescence pour suivre l'accumulation d'AGEs au cours de la réaction. Les pics représentatifs de la liaison entre le ribose et le collagène en FT-IR étaient situés à 1083 et 1040 cm^{-1}. Grâce à cette méthode, les auteurs constaté une relation linéaire entre la concentration en ribose et la quantité de ribose liée aux protéines.

Dans la perspective d'une texturation naturelle des aliments sans ajout d'additifs texturants, la mise en œuvre de la réaction de glycation en couplage de l'impression 3D alimentaire apparaît comme une solution supplémentaire à explorer, à condition qu'elle soit parfaitement maîtrisée afin d'éviter la formation d'AGEs nocifs pour la santé humaine. Cependant, cette voie nécessite encore des études pour comprendre les interactions potentielles entre l'I3D et la glycation, car les effets de cette réaction sur les propriétés mécaniques et la sécurité de l'aliment dépendront, entre autres, de la composition de l'aliment imprimé et, des conditions appliquées (en termes de température, de teneur en eau, de pression, de pH, *etc*.). À cet égard, la modélisation mathématique et la simulation numérique sont susceptibles d'être des outils précieux pour la conception virtuelle d'aliments texturés imprimés en 3D, car ces approches numériques peuvent prendre en compte un large éventail de données allant des conditions du procédé d'impression et de la cinétique réactionnelle à la formulation des matières

premières et à la microstructure du produit.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Liste des différents matériels et réactifs utilisés

Les tableaux présentés ci-après rassemblent les différents matériels et réactifs utilisés lors des expérimentations relatives au présent chapitre, à savoir les matériels de laboratoire (**Tableau 2.5**), les produits et ingrédients utilisés pour la préparation des gels de gélatine (**Tableau 2.6**), les réactifs utilisés par type d'analyses (**Tableau 2.7**), les résultats des teneurs en eau mesurées pour les différents ingrédients nécessaires à la préparation des gels de gélatine (**Tableau 2.8**), ainsi que l'ensemble des logiciels utilisés pour l'acquisition ou le traitement des données (**Tableau 2.9**).

Les gélatines utilisées se présentaient sous forme de poudre. Elles avaient été préalablement extraites de peaux de porc (type A, taille des particules : 8, 18 et 30 mesh) (Rousselot, Espagne). Les gels de gélatine ont été préparés, soit de l'eau ultrapure, soit une solution tamponnée, en fonction des paramètres à tester (**Tableau 2.6**). Un ose réducteur a été ajouté afin de permettre la réaction de glycation. Des gélatines à 75 et 200 Bloom ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations destinées à déterminer les conditions réactionnelles.

Ces gélatines, achetées en lots afin de standardiser les différentes expérimentations, ont été choisies sur la base de leurs indices Bloom, de façon à être représentatives des pratiques de l'industrie agro-alimentaire (Kuai, Liu, Ma, Goff & Zhong, 2020 ; Yang et al., 2022). Des gels de cette gamme d'indices Bloom ont également été utilisés en tant que milieux modèles pour des études sur les mécanismes de la mastication, à l'instar des travaux de (Hennequin, Allison, Veyrune, Faye & Peyron, 2005).

Tableau 2.5. *Liste des matériels utilisés pour les expérimentations de glycation de gels de gélatine.*

Matériels	**Fournisseurs**
Balance de précision DeltaRange AG204	Mettler Toledo, France
Ph-mètre MA235, sonde Inlab 427	Mettler Toledo, France
Etuves thermostatées KB115 et KB240 -10 +110 °C	Binder GmbH, Allemagne
Agitateurs magnétiques Ikamag RH	Janke & Kunkel Ika labortechnik, Allemagne
Agitateur à retournement Tube Revolver	Thermo Scientific, Allemagne
Agitateur Roto-therm MiniPlus	Benchmark Scientific, USA
Valets développés au laboratoire	**Annexe V 3**
Spectrophotomètre UV-visible-proche IR V-670	Jasco, France
Disperseur Polytron PT2100	Kinematica, Suisse
Purificateur d'eau Direct-Q3	Millipore, France
Four de dessication ED240 +300 °C	Binder GmbH, Allemagne
Spectrocolorimètre CM 2500d	Konica Minolta, Japon
Texturomètre Modèle 5543	Instron, USA
Capteur de force ±5 - ±100 N	Instron, USA
Texturomètre EZ-Test LX	Shimadzu, France
Capteur de force 100N ± 1%	Shimadzu, France
Rhéomètre HAAKE MARS iQ Air	Thermo Electron GmbH, Allemagne
Spectromètre Direct Detect®	Merck Millipore, France
Spectromètre de masse Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF	Bruker Daltonics, USA
Spectromètre de masse NanoLC-MS/MS Orbitrap-HFX	Thermo Fisher Scientific, USA
Vibro-boyeur MM400	Retsch, Allemagne
Cryomicrotome Leica CM1950	Leica Biosystems, Allemagne
Ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E	Leica Biosystems, Allemagne
Microscope Electronique à Transmission H7650	Hitachi, Japan
Caméra digitale couplée au MET	Hamamatsu Photonics, Japan
Spectromètre infrarouge Nicolet iN10	Thermo Scientific, USA

Tableau 2.6. *Liste des produits utilisés dans la composition des différents gels de gélatine.*

Gélatines	Fournisseurs	Glucides	Fournisseurs	Solvants	Fournisseurs
75 Bloom **125 Bloom** **175 Bloom** **200 Bloom** **250 Bloom**	Rousselot, Espagne	***D*-glucose** monohydraté ≥99% 198,17 $g.mol^{-1}$ ***D*-Fructose** 180,16 $g.mol^{-1}$ ***D*-Ribose** ≥98% 150,13 $g.mol^{-1}$	Sigma-aldrich, France	**Eau ultra-pure** 18,2 $M\Omega.cm^{-1}$ **Phosphate Buffered Saline** (PBS) pH 7,4 Tris - Trizma® Pre-set crystal **pH 7,0** Tris - Trizma® Pre-set crystal **pH 8,0** Tris - Trizma® Pre-set crystal **pH 9,0** Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck Millipore, France Sigma-aldrich, France

Tableau 2.7. *Liste des réactifs utilisés en fonction des méthodes analytiques mises en œuvre pour caractériser la réaction de glycation dans les gels de gélatine.*

Réactifs	**Type d'analyses**	**Références**
H_2SO_4	Méthode de Dubois	Dubois et al. (1956)
Phénol	Méthode de Dubois	
2-Méthylbutane	Cryofixation	Sigma-Aldrich, Allemagne
Glutaraldéhyde	MET	Sigma-Aldrich, Allemagne
Tampon Cacodylate		
Osmium tetroxide		
Ethanol		
Oxyde de propylène		
Résine époxy		TAAB, Eurobio, France
Acétate d'uranyl		
EthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA)	Maldi-TOF/TOF LC-MS/MS	Sigma-Aldrich, Allemagne
DodécylSulfate de Sodium (SDS)		
DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT)		
Acide trifluoroacétique et acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		
Acide trifluoroacétique (TFA)		
Acide Sinaptique (SA)		
Acetonitrile		
Trypsine pancréatique porcine		
Chymotrypsine		
Collagénase type 1		
Bicarbonate d'ammonium		
Acide trifluoroacétique		

Tableau 2.8. *Teneurs en eau mesurées dans les ingrédients utilisés pour la préparation des gels de gélatine et prises en compte dans les calculs de masse pour la préparation de ces gels.*

Ingrédients	Teneur en eau (kg_{eau}/kg_{MS})
Gélatine 75 Bloom	0,12
Gélatine 125 Bloom	0,14
Gélatine 175 Bloom	0,13
Gélatine 200 Bloom	0,16
Gélatine 250 Bloom	0,16
D-Glucose	0,10
D-Fructose	0,03
D-ribose	0,03

Tableau 2.9. *Ensemble des logiciels utilisés pour l'acquisition ou le traitement des données expérimentales en lien avec la caractérisation de la glycation dans des gels de gélatine.*

Logiciel	Type d'analyses	Références
SpectraMagic™*NX*	Mesures de couleur	Konica Minolta, Japon
FlexControl 3.4	MS/MS	Bruker Daltonics, Allemagne
PeaksX-PRO software	MS/MS	Bioinformatics Solutions Inc., Canada
Mascot	MS/MS	Matrix Science, USA
OMNIC Picta	FT-IR	Thermo Electron GmbH, Allemagne
The Unscrambler 9.8	FT-IR	CAMO Software, Norvège
Trapezium X	Texture	Shimadzu, France
Bluehill 3	Texture	Instron, USA
RheoWin™	Rhéologie	Thermo Electron GmbH, Allemagne
NIS-Elements D 5.30.03	Microscopie	Nikon Instruments INC, USA
Matlab® R2019b	Rhéologie	The MathWorks, USA
Statistica 14.0.015	Statistiques	Tibco Software Inc., USA

2.2.2. Détermination des paramètres réactionnels à partir d'études préliminaires

Différentes approches ont été utilisées pour déterminer, lors d'expériences préliminaires, les paramètres réactionnels optimaux, ainsi que l'état d'avancement de la réaction.

2.2.2.1. Préparation des gels de gélatine pour la détermination des paramètres réactionnels

La teneur en eau des gels a été contrôlée, en tenant compte de la quantité d'eau présente dans chaque ingrédient et de la quantité de solvant ajoutée. La préparation des gels s'est faite selon le mode opératoire présenté en **Annexe S 2.1**.

- ***Mesure de la teneur en eau***

La teneur en eau a été mesurée pour chacun des ingrédients. Pour ce faire, deux grammes ont été pesés et placés, pendant 24 h, dans une étuve, à 105 °C. La teneur en eau a été calculée en utilisant l'équation 2.1 :

$$X = \frac{mi - mf}{mf} \qquad \text{Eq. 2.1}$$

Avec *X* : la teneur en kg_{eau}/kg_{MS} (MS : Matière Sèche) ; *mi :* la masse de l'échantillon avant déshydratation (g) ; et *mf :* la masse de l'échantillon après déshydratation (g).

La masse d'eau de chaque ingrédient a été prise en compte dans le calcul de la teneur en eau finale du gel, dont la valeur était fixée par (Eq. 2.2) :

$$Qs = X \times \Sigma(MS - tot\ eau) \qquad \text{Eq. 2.2}$$

Avec *Qs* : la quantité de solvant à ajouter (g) ; *X* : la teneur en eau (kg_{eau}/kg_{MS}) ; *MS* : la quantité de matière sèche totale présente dans les produits (g) ; et *tot eau* : la quantité d'eau totale présente dans les produits (g).

- ***Mesure du pH***

Pour cette mesure, un gramme de gel a été prélevé et 9 mL d'eau ultra-pure ont été ajoutés. Le mélange a été dispersé au Polytron (**Tableau 2.5**) à 21000 $tr.min^{-1}$, pendant 30 s. Les mesures de pH ont été effectuées avec une sonde 'Inlab 427' préalablement étalonnée et reliée et à un pH-mètre MA235 (**Tableau 2.5**).

2.2.2.2. Evaluation des effets de la glycation par mesure de la texture

Une fois les gels coulés et la réaction de glycation stoppée par refroidissement dans la glace, la méthode au pénétromètre permet de comparer la résistance mécanique entre les échantillons. Il s'agit d'un test rapide, réalisé sur le texturomètre Instron 5543 (**Tableau 2.5**). Le capteur de force utilisé était de 50 N.

Les courbes obtenues représentent la charge de compression (en N) en fonction de la déformation de compression (en %). Le choix de la sonde de compression influence la mesure, deux types de sonde ont donc été testées. Dans un 1er temps, une sonde de 10 mm de diamètre a été montée sur le système de mesure et, dans ce cas, le point de fracturation du gel était visible (**Figure 2.11**), avec potentiellement des effets de bords. Une sonde de 2 mm a été ensuite fabriquée afin de limiter ces effets et multiplier le nombre de mesures sur un même gel. Cependant, les forces mesurées étaient plus faibles et parfois en limite de sensibilité du capteur (qui avait néanmoins une linéarité de ± 0,25 % entre 0,4 et 100 % de sa capacité de charge).

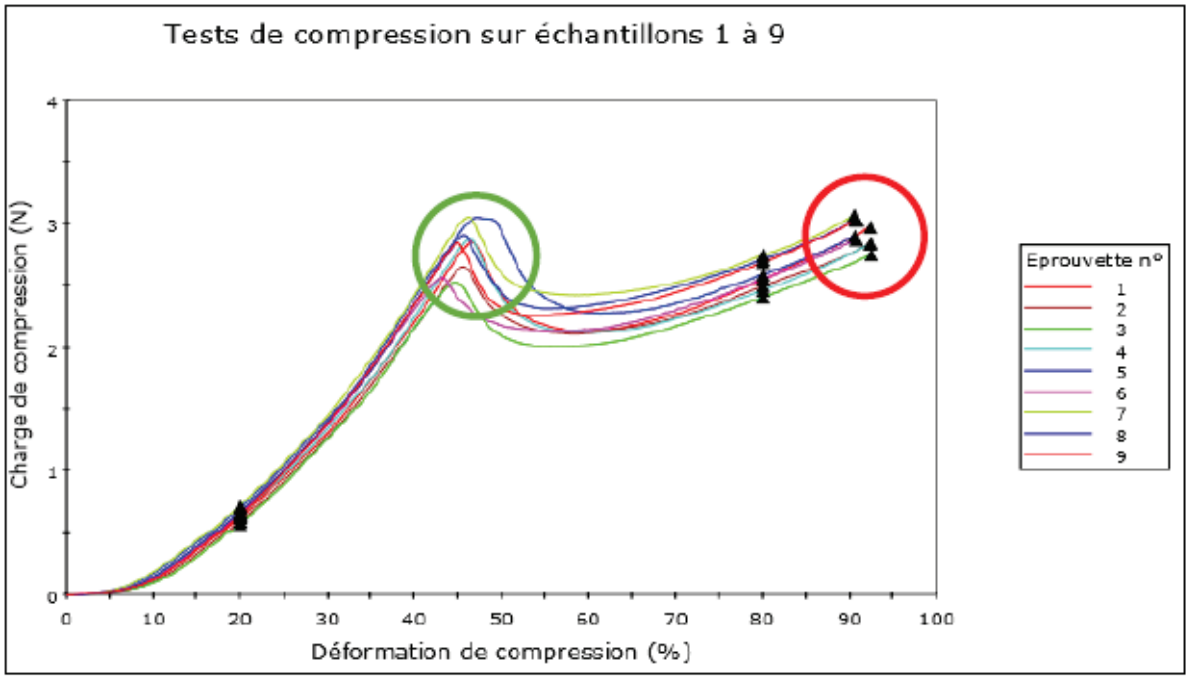


Figure 2.11. *Effet d'une sonde de pénétration de 10 mm de diamètre sur un gel de gélatine. Malgré une répétabilité acceptable (n=9 répétitions), la charge de compression est faible, proche de la limite de détection du capteur de force et, la déformation liée à la compression se traduit par 2 pics (entourés en vert et en rouge). Le second pic (entouré en rouge) se produit après la fracture du gel.*

Afin de vérifier la répétabilité des mesures avec la sonde de 2 mm, des dispositifs servant de guide ont été conçus par I3D polymère, afin de réaliser les mesures de pénétrométrie de manière

équidistante sur les gels coulés. Au final, 5 points de mesure ont été réalisés pour les gels coulés dans des tubes de 27 mm de diamètre, ou 36 points de mesure pour les gels coulés dans des récipients de 90 mm de diamètre (**Figure 2.12**) (*cf*. 2.3.1.2.1).

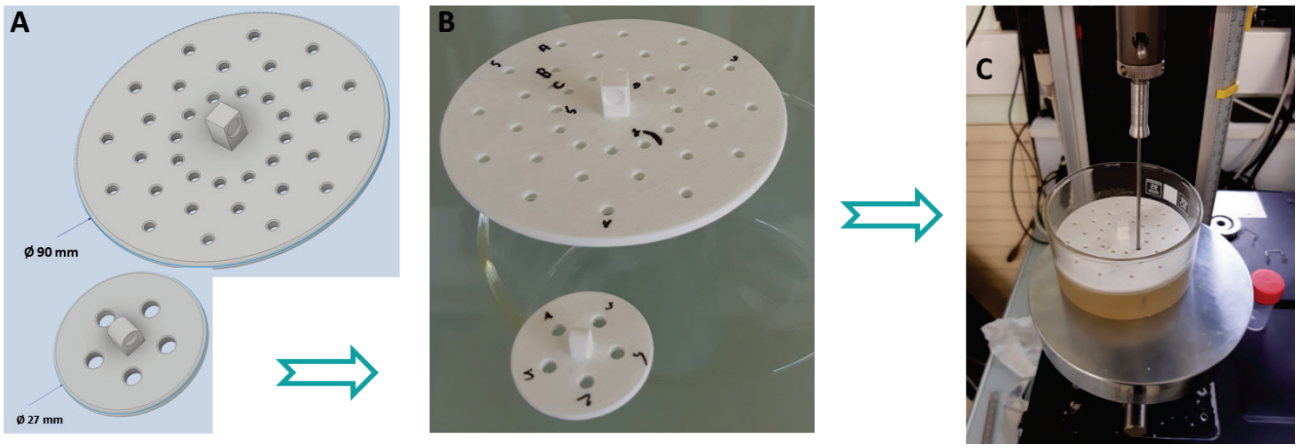


Figure 2.12. *Dispositifs permettant de tester la répétabilité des mesures du pénétromètre pour des gels de diamètre 27 et 90 mm. A - Conception des dispositifs (CAO), B – Dispositifs imprimés en 3D (acide polylactique), et C – Mesures sur le texturomètre Instron dans le cas d'un gel de 90 mm de diamètre.*

Pour caractériser la texture des gels, nous avons utilisé la méthode de *Texture Profile Analysis* (TPA). Cette méthode qui consiste à appliquer deux déformations successives à un échantillon simule l'action de mastiquer. La force nécessaire à cette déformation est mesurée tout au long du test, et l'analyse de la courbe obtenue permet de déterminer différents paramètres relatifs au produit : la fermeté, l'élasticité, l'adhérence, la cohésion et la masticabilité. Cette méthode, mise en œuvre au moyen d'un texturomètre Shimadzu (**Tableau 2.5**), a permis d'évaluer l'effet de la glycation sur la texture des gels. Les mesures ont été réalisées selon les conditions suivantes : échantillon cylindrique de 20 x 10 mm, sonde de compression de 50 mm de diamètre, détection de surface à 0,5 N, vitesse de déplacement de 20 mm/min et double compression à 50 % de la hauteur de l'échantillon. Les échantillons de gel ont été placés à température ambiante 2 heures avant les mesures.

2.2.2.3. Etat d'avancement de la réaction de glycation par spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible

Le suivi de l'avancement de la réaction de glycation a été adapté du mode opératoire de Stevenson et al., (2020). Les mesures ont été effectuées avec un spectrophotomètre d'absorption moléculaire (**Tableau 2.5**) entre 200 et 800 nm, à l'aide de cuves en quartz optique (Fisherbrand,

France). Les cuves possédaient un trajet optique d'une longueur de 10 mm et, étaient adaptées à des longueurs d'ondes comprises entre 260 et 2500 nm. Le mode opératoire était le suivant :

- Peser 10 mL d'eau ultrapure dans un ballon ;
- Ajouter 0,1 g de gel solide ;
- Homogénéisation au Polytron (30 s) ;
- Faire chauffer le tout au bain-marie à 45 °C ;
- Mélanger au moins 2 fois afin de dissoudre complètement le gel ;
- Dilution au 1/100 pour obtenir des valeurs d'absorbance inférieures à 1,5 (Ajandouz et al., 2001).

2.2.2.4. Mise en évidence de la formation de bases de Schiff par approche protéomique

2.2.2.4.1. Hydrolyse enzymatique des gels de gélatine

Etant donné la taille des protéines présentes dans les gels, une étape d'hydrolyse était nécessaire.

- ***Préparation des gels de gélatine***

Les gels de gélatine ont été préparés selon le mode opératoire présenté en **Annexe S 2.1**. La méthode de coulage des gels est la suivante :

- Placer les moules cylindriques de 4 x 10 mm dans un bac de glace ;
- Couler le gel dans les moules à l'aide d'une pipette automatique P1000 ;
- Laisser 15 min dans la glace pour la prise en masse ;
- Démouler.

- ***Mode opératoire relatif à l'hydrolyse enzymatique***

Trois enzymes ont été testées : la trypsine, la chymotrypsine et la collagénase de type I (ajoutées à hauteur de 2 mg par tube). La méthode d'hydrolyse est décrite en **Annexe S 2.2**.

Après digestion enzymatique, les peptides ont été séparés des protéines résiduelles non digérées par ultrafiltration (pendant 2 h, à 10 000 g, à température ambiante) sur une colonne Vivaspin 500 (5000 Da MWCO, Sartorius, Allemagne).

- ***Contrôle de l'hydrolyse***

La méthode infrarouge « Direct Detect® » (**Tableau 2.5**) a été utilisée en première intention, avant la spectrométrie de masse, pour mesurer la concentration en peptides. Cette méthode a permis de réaliser des dosages dans la gamme de concentration 250-5000 $\mu g.m^{-1}$, pour un volume d'échantillon de 2 µL, par détermination du nombre de liaisons amides.

2.2.2.4.2. Analyses par spectrométrie de masse Maldi-TOF/MS

Un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF a été utilisé, équipé d'un laser *Smartbeam* et utilisant le logiciel *FlexControl* (**Tableau 2.5** et **Tableau 2.9**). La source d'ionisation était une source MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et l'analyseur était de type TOF, c'est-à-dire qu'il était basé sur le calcul du temps de vol de l'échantillon afin de l'analyser (''TOF = *Time Of Flight*''). Le MALDI-TOF/MS est une technique analytique largement utilisée en raison de sa sensibilité, de sa vitesse relativement élevée et de sa simplicité. Le MALDI-TOF est particulièrement adapté à l'analyse de mélanges de protéines, avec ou sans préfractionnement. Son seul inconvénient est sa faible reproductibilité qui rend les mesures quantitatives plus difficiles.

- ***Préparation des échantillons pour analyse Maldi-TOF/TOF***

Les échantillons ont été préparés selon le mode opératoire présenté en **Annexe S 2.3**. Une fois les protéines extraites, celles-ci ont été purifiées, puis déposées sur les cibles du MALDI-TOF/TOF avec de la matrice en excès. L'échantillon et la matrice vont pouvoir ainsi co-cristalliser et cette dernière jouera un rôle protecteur de l'échantillon vis-à-vis du faisceau laser. Par ailleurs, les échantillons ont dû être déposés à proximité du calibrant peptide. Le calibrant, également appelé étalon externe, est un mélange connu de peptides (masses connues). La calibration est dite « externe/proche », car le calibrant doit être déposé géographiquement à proximité des échantillons. Il faut compter 1 calibrant pour 8 échantillons à analyser. L'étalonnage doit être réalisé entre chaque échantillon.

Bien qu'il existe des matrices polyvalentes, il est préférable d'utiliser des matrices spécifiques à l'échantillon. En effet, l'évaluation de la meilleure matrice en fonction des caractéristiques de l'échantillon (masse moléculaire, composition…) et la détermination de la concentration du ratio matrice/échantillon optimal permettent d'affiner la mesure. Durant nos expériences, deux matrices ont été testées (SA et HCCA). La matrice HCCA (composition en **Annexe S 2.3**) a été sélectionnée. Cette matrice étant préférentiellement utilisée pour les molécules dont la masse moléculaire n'excède pas

10 kDa. Le dépôt a été également fait soit en mélangeant les protéines et la matrice au préalable, soit en les déposant de façon séparée. Il est apparu que réaliser le dépôt en deux temps était plus efficace. Le dépôt sur la plaque MALDI s'est donc fait en déposant 1 µL de l'échantillon, puis 1 µL de matrice HCCA.

Une fois la plaque introduite dans le spectromètre, les cristaux formés sont bombardés de tirs lasers à 337 nm pendant quelques nanosecondes, provoquant à la fois la désorption des molécules analysées en phase gazeuse et le transfert de protons permettant l'ionisation. En fonction de la source du spectromètre, les ions formés sont des ions $[M-H]^-$ ou $[M-H]^+$. Pour les protéines et les peptides, l'analyse se fait généralement en mode positif. Les ions formés (il s'agit d'un abus de langage, en réalité, ce sont des molécules chargées et non des atomes chargés) passent ensuite de façon synchronisée dans un tube sous vide, appelé tube de vol, pour atteindre le détecteur. En fonction du temps passé dans le tube, l'analyseur va pouvoir déduire la masse moléculaire de chaque ion. Pour de petites molécules (MM < 3,5 kDa), il est possible d'utiliser l'appareil en mode « *reflectron* » ou « refocalisation » (par opposition au mode linéaire). Cette technique consiste à renvoyer les ions dans le tube de vol une seconde fois, lorsque ces derniers en ont atteint l'extrémité. En parcourant le même chemin à nouveau, on peut doubler leur temps de vol et ainsi gagner en résolution, au détriment de la sensibilité, car une partie de l'échantillon est souvent perdue.

Il est ainsi possible de réaliser l'empreinte de masse peptidique (PMF, *Peptide Mass Fingerprint*) d'une protéine, en la clivant en plusieurs peptides par digestion enzymatique et en les analysant. Le spectre obtenu présente alors plusieurs pics représentant chacun un peptide et indiquant sa masse moléculaire. Cette première information sur la protéine n'est pas toujours suffisante à son identification et il est alors nécessaire de fragmenter les peptides eux-mêmes. On obtient alors une « *Peptide Fragment Fingerprint* » (PFF) et, en étudiant les différences de masses entre chaque fragmentation, on peut déterminer la composition en acides aminés du peptide.

2.2.2.4.3. Analyses par LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry)

Comme pour les analyses par MALDI-TOF/TOF, les modes opératoires de préparation des échantillons et d'hydrolyse des gels sont présentés en **Annexe S 2.1** et **Annexe S 2.2**. Après digestion enzymatique, les peptides ont été séparés des protéines résiduelles non digérées. Les étapes de purification et de concentration des peptides ont été réalisées à l'aide d'une colonne *Peptide Cleanup C18 Spin tubes* (Agilent, California, USA), selon les recommandations du fabricant. Tout d'abord, 50 µL

de solution filtrée ont été déposés sur la colonne, puis les peptides retenus sur la colonne chromatographique C18 ont été élués avec une solution aqueuse contenant 70 % d'acétonitrile (v/v). L'hydrolysat de peptides obtenu a ensuite été analysé par spectrométrie de masse NanoLC-MS/MS Orbitrap-HFX (**Tableau 2.5** et **Tableau 2.7**). L'identification des peptides et des modifications de glycation a été réalisée avec le logiciel *PeaksX-PRO* (**Tableau 2.9**), en utilisant la bibliothèque de séquences protéiques *suscrofa* (49792 seq, uniprot). Comme il s'agissait d'une approche exploratoire, seule la gélatine d'indice 200 Bloom a été analysée par cette méthode.

2.2.3. Etude des mécanismes de la glycation dans un gel de gélatine

2.2.3.1. Préparation des échantillons et design expérimental

Les gélatines utilisées étaient de type A, issues de peau de porc, de degré Bloom 125 (B125) et 200 (B200) et de teneurs en eau initiales 0,15 et 0,16 kg_{eau}/kg_{MS}, respectivement (Rousselot®, Espagne). Les poudres de gélatine ont été équilibrées en teneur en eau, en les plaçant pendant 10 jours dans des récipients étanches (à 18 °C et à l'obscurité) contenant soit un volume d'eau en excès par rapport à la quantité de poudre, soit du gel de silice (en excès également) préalablement déshydraté. Des poudres de teneurs en eau égales à 0,06 et 0,34 kg_{eau}/kg_{MS} ont ainsi été obtenues pour B125 et, égales à 0,06 et 0,42 kg_{eau}/kg_{MS} pour B200 (**Figure 2.13**). Les teneurs en eau ont été mesurées à chaque étape du protocole expérimental (**Figure 2.13**). Ces poudres ont été ajoutées à une solution de tampon Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol) 1 M (**Tableau 2.6**), afin de maintenir le pH réactionnel à 9 ± 0,5. En tenant compte de la quantité de tampon ajoutée, de la fraction d'eau contenue dans les poudres de gélatine et de *D*-ribose (ajout de 7 % en masse pour les conditions glyquées), nous avons obtenu des gels d'une teneur en eau égale à 2,68 ± 0,04 kg_{eau}/kg_{MS} pour la condition sèche (S) et égale à 3,74 ± 0,11 kg_{eau}/kg_{MS} pour la condition humide (H) (a_w : 0,961 et 0,964 respectivement), pour chacun des deux indices Bloom testés. La réaction de glycation a été initiée (hors conditions « témoins ») par l'ajout de *D*-ribose (0,03 kg_{eau}/kg_{MS}). L'ensemble du mélange a été placé sur un agitateur rotatif à retournement (**Tableau 2.5**), dans une étuve régulée à 50 °C (**Tableau 2.5**), jusqu'à dissolution et homogénéisation de la gélatine. Au bout de 3 h sous agitation, les gels ont été coulés dans des moules cylindriques en acier inoxydable (20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur), refroidis dans de la glace pour les mesures de *Texture Profile Analysis* (TPA) et les mesures colorimétriques et, dans des moules de 10 mm de diamètre pour 20 mm de hauteur pour les observations en microscopie électronique. Après 15 min de prise en masse sur un lit de glace, les

échantillons ont été placés, à 4 °C, dans des récipients étanches. Pour les mesures de rhéologie, les gels ont été coulés dans des moules cylindriques de 38x1 mm, imprimés en 3D en acide polylactique (PLA). Etant donné leur faible épaisseur, les gels ont été coulés à température ambiante, avant d'être recouverts d'une plaque de verre pour assurer une épaisseur homogène, puis placés à 4 °C. Les mélanges « témoins » ont été strictement préparés de la même façon, en absence de *D*-ribose, et chaque mélange a été réalisé en triplicat (3 gels « témoins » et 3 gels glyqués, préparés simultanément). La nomenclature des échantillons préparés est présentée dans le **Tableau 2.10**.

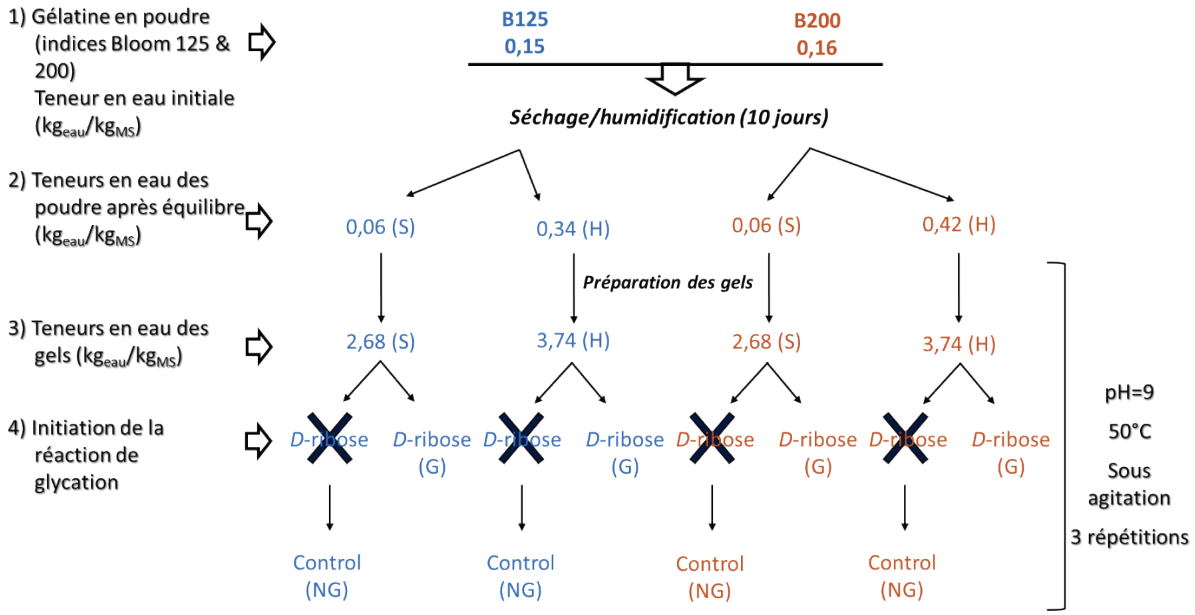


Figure 2.13. *Démarche expérimentale utilisée pour comprendre les mécanismes de la glycation au sein de gels de gélatine.*

Tableau 2.10. *Nomenclature des échantillons de gels de gélatine préparés pour les différentes analyses.*

Gélatine	Abréviation	Teneur en eau	Abréviation	Glycation	Abréviation
Indice Bloom 125	**B125**	Sec (2,68 kg_{eau}/kg_{MS})	**S**	Non-glyqué (sans *D*-ribose)	**NG**
Indice Bloom 200	**B200**	Humide (3,74 kg_{eau}/kg_{MS})	**H**	Glyqué (avec *D*-ribose)	**G**

2.2.3.2. Méthodes utilisées pour la caractérisation de la glycation

2.2.3.2.1. Colorimétrie

Un des marqueurs de la réaction de glycation est le changement de couleur (jaune/orangé à brun). La couleur a été mesurée au moyen d'un spectrocolorimètre (**Tableau 2.5**) dans l'espace de couleur CIELAB (D65-10°-L*a*b*-d/8 SCE). Cet instrument a été calibré à 0 (dans l'air) et avec un blanc standard (n°7009694). Les mesures de couleur ont été effectuées sur des gels de 10 mm d'épaisseur,

préalablement placés sur une feuille de papier blanc. La différence de couleur totale (ΔE*) a été calculée entre les échantillons témoins et les essais (G *vs.* NG), en utilisant la relation suivante :

$$\Delta E* = \sqrt{(\Delta L*)^2 + (\Delta a*)^2 + (\Delta b*)^2} \qquad \text{Eq. 2.3}$$

2.2.3.2.2. Caractérisation ultra-structurale par microscopie électronique à transmission

Les échantillons ont été préparés pour les observations en microscopie électronique à transmission (MET) à partir de cylindres de gel. Ils ont d'abord été fixés dans une solution composée de 2,5 % de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium à 0,1 M, pH 7,4 et, conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons ont été post-fixés 1 h dans du tétroxyde d'osmium à 1 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M et, déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante puis dans de d'oxyde de propylène pur avant d'être inclus dans une résine époxy (Theron et al., 2011). Des coupes ultrafines (90 nm) ont été colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds, 1963). Le protocole complet est décrit en **Annexe S 2.5**. Les coupes ultrafines ont été examinées par MET avec une tension d'accélération de 80 kV aux grossissements suivants : x8000, x2500 et x70000 (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé – CICS, université Clermont-Auvergne). Cent-cinquante images ont été acquises à l'aide d'une caméra numérique (**Tableau 2.5** et **Tableau 2.7**)

2.2.3.2.3. Analyse de la composition chimique et de la structure macromoléculaire des protéines

Les échantillons ont été cryofixés (mode opératoire en **Annexe S 2.5**) par immersion dans du 2-methylbutane refroidi par de l'azote liquide. Des coupes de 6 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryomicrotome à -25 °C (**Tableau 2.5**) et placées sur des fenêtres BaF2 circulaires de dimensions 13x1 mm (Crystran Limited, Poole, Royaume-Uni). Les coupes ont été séchées à température ambiante afin d'éliminer l'eau libre des échantillons.

Les coupes ont été analysées en spectroscopie FT-IR grâce à un spectromètre Nicolet iN10 (Thermo Scientific). Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel *OMNIC Picta* (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA). L'acquisition des spectres s'est faite en transmission avec un détecteur refroidi à l'azote liquide, une fenêtre d'acquisition de 30 x 30 µm et une résolution d'acquisition de

2 cm^{-1} sur l'intervalle 4000-675 cm^{-1}. Pour chaque coupe, 30 spectres résultants de l'accumulation de 64 acquisitions (64 scans) ont été acquis. Le spectre du bruit de fond résultait de l'accumulation de 128 acquisitions. Les spectres ont ensuite été prétraités avec le logiciel "*The Unscrambler*" (**Tableau 2.9**). Une transformation linéaire des spectres a été effectuée par la méthode *Extended Multiplicative Signal Correction* (EMSC), puis les spectres ont été dérivés en utilisant la méthode de Stavitzky-Golay avec 7 points de lissage et un polynôme d'ordre 2, afin d'améliorer la résolution des bandes spectrales et pour minimiser les variations de la ligne de base. Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées avec "*The Unscrambler*". Les nombres d'onde les plus discriminantes ont été identifiées à partir des *loading plots* des ACP et, des comparaisons de moyennes (Test de Student) ont été mises en œuvre pour vérifier si les variations d'absorbance à ces nombres d'onde étaient significativement différentes.

2.2.3.2.4. Comportement rhéologique

Le comportement rhéologique des gels a été caractérisé au moyen d'un rhéomètre (**Tableau 2.5**) équipé d'une géométrie plan-plan striée de 35 mm de diamètre, avec un entrefer de 1 mm. La température des échantillons a été régulée à 20 °C ± 1 °C. Un balayage en contrainte à une fréquence de 1 Hz a été effectué. Ont été ainsi déterminées les valeurs de contrainte de cisaillement au croisement des modules viscoélastiques (τ-croisement), la valeur du module élastique dans le domaine viscoélastique linéaire (G'max) et la contrainte de cisaillement à la fin du domaine viscoélastique linéaire (τ-fin-LVR). Ces paramètres seront définis dans le **Chapitre 3**.

La mesure des paramètres rhéologiques des gélatines B200 s'est avérée délicate à cause de leur fermeté élevée. Afin de déterminer la fin du domaine viscoélastique linéaire (τ-fin-LVR) et la valeur de τ (contrainte de cisaillement) à ce point qui correspond à une baisse de 10 % de la valeur du module élastique G' et, en raison de l'échec de l'algorithme du logiciel du rhéomètre dans certains cas (*RheoWin*™), nous avons codé un script interne (Matlab®). Dans le domaine de contraintes (τ) supérieur à 500 Pa, afin d'éliminer les variations initiales, le point de plus faible gradient a été défini comme étant dans la partie plate. Les points de τ inférieurs ont ensuite été ajoutés à ce qui est considéré comme la première partie de la portion plate, tant que la différence absolue entre leur valeur du module G' et le point adjacent restait inférieure à 10 %. Selon ce critère, le point τ le plus bas définit le début de la partie utile de la courbe et de la partie plate. Dans cette portion utile, des points de τ plus élevés ont été ajoutés progressivement, tant que la valeur moyenne du module G' restait inférieure à 10 % de la moyenne précédente. Enfin, et afin de compenser l'intervalle entre les

points de données, la valeur de τ pour une chute de 10 % a été estimée par interpolation linéaire entre le dernier point avant la limite et le premier point la dépassant.

2.2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica (**Tableau 2.9**). Les données ont été analysées par le test de Grubbs pour détecter les valeurs aberrantes. En fonction des données, différents tests statistiques ont aussi été mis en œuvre :

- Analyse de variance (ANOVA) à un facteur, en respectant les conditions de normalité et d'homoscédasticité des échantillons ;
- Le test de Tukey a été utilisé pour les comparaisons multiples *post-hoc*, le niveau de significativité étant fixé à $P < 0,05$;
- Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, qui est un test statistique non paramétrique qui permet de tester l'hypothèse selon laquelle les distributions de chacun de deux groupes de données sont proches, a aussi été utilisé. Le niveau de significativité a été fixé à $P < 0,05$;
- Les données de FTIR ont été statistiquement comparées par un test de Student (Excel, version 2019), avec un risque α de 5% ;
- Les résultats ont été exprimés en moyennes ± erreur standard à la moyenne (SEM).

2.3. Résultats et discussions

2.3.1. Mise au point des gels de gélatine et détermination des paramètres réactionnels au cours des études préliminaires

2.3.1.1. Choix de l'ose réducteur

Dans le cadre d'expériences préliminaires, la réaction de glycation a été testée avec 3 oses différents : 1) le glucose, qui est le glucide le plus utilisé pour les réactions de glycation, car communément apporté dans l'alimentation, 2) le fructose, car il pourrait présenter un intérêt nutritionnel pour les séniors, en limitant le catabolisme des acides aminés (Dardevet, Mosoni, David & Polakof, 2018), et 3) le ribose, possédant une structure moléculaire plus adaptée (*cf*. 2.1.4.2). A noter que le ribose était un sucre « à la mode » dans les années 1990, car employé alors pour la nutrition des sportifs. Seuls les résultats relatifs au ribose seront présentés dans ce chapitre. Ce choix

a été fait à partir des résultats préliminaires (présentés ci-après) et de données bibliographiques.

2.3.1.2. Méthodes d'évaluation de l'effet de la glycation sur un gel de gélatine

Afin de déterminer les paramètres réactionnels optimaux de la glycation dans des gels de gélatine (température, pH, durée, concentration en ribose), deux méthodes ont été utilisées : des mesures de pénétrométrie pour évaluer la force maximale des gels, et la mesure d'absorbance à 294 nm.

2.3.1.2.1. Mise au point et répétabilité des mesures de pénétrométrie

Comme indiqué dans la section 2.2.2.2, avec une sonde de 10 mm de diamètre, il arrive que la charge de compression du gel augmente à nouveau après la rupture (**Figure 2.11**), conduisant à un second pic qui peut être, dans certains cas, supérieur au premier. Ce comportement peut s'expliquer, par exemple, par la forte proximité de la sonde avec la paroi du tube (1 ou 2 mm) en fin de course.

Une sonde de 2 mm de diamètre permet d'augmenter le nombre de mesures sur un même gel. La **Figure 2.14** montre la répétabilité obtenue, avec cette sonde, en utilisant le gabarit décrit en section 2.2.2.2 La valeur aberrante mise en évidence par le test de Grubbs peut provenir d'une erreur de manipulation ou d'une fragilité dans la structure du gel induite par la présence d'une bulle d'air.

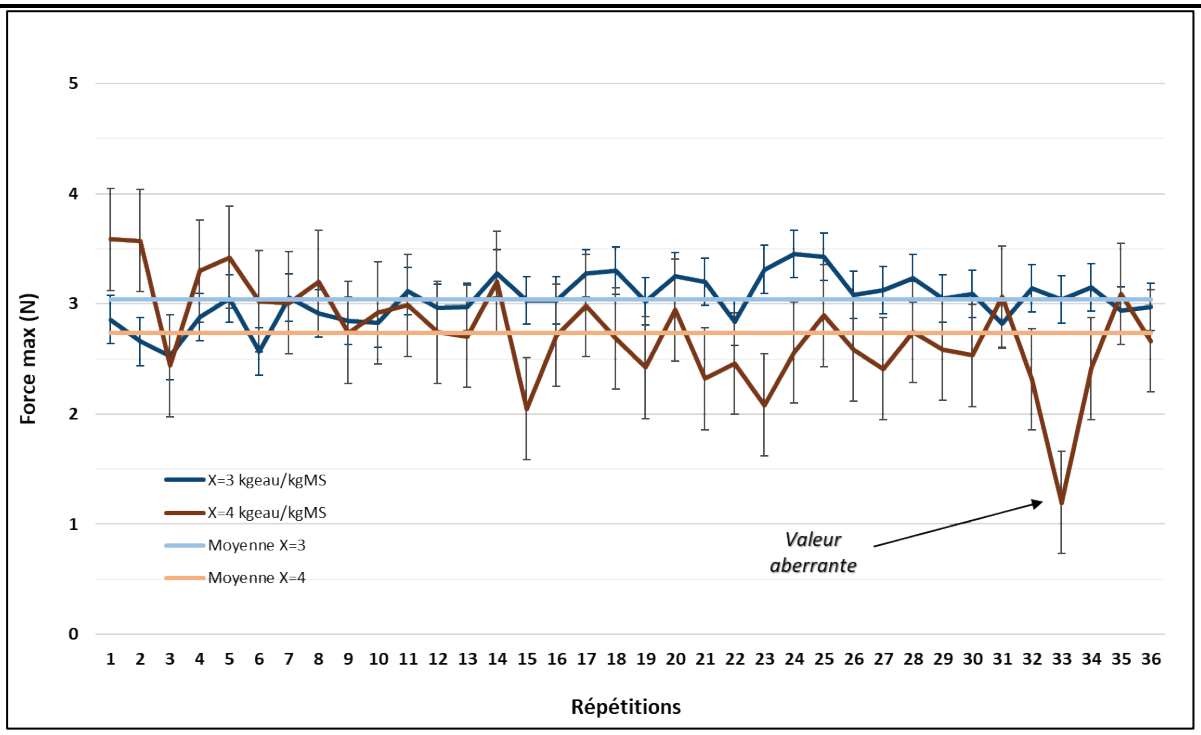


Figure 2.14. *Mesures de répétabilité (n=36) de la force maximale avec une sonde de pénétration de 2 mm de diamètre sur des gels de gélatine de 90 mm de diamètre et de teneurs en eau égales à 3 kg_{eau}/kg_{MS} (bleu foncé) et à 4 kg_{eau}/kg_{MS} (bleu foncé). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type. Une valeur aberrante a été mise en évidence par le test de Grubbs (P-value = 0,01) pour la mesure 33 (gel à 4 kg_{eau}/kg_{MS}).*

En s'appuyant sur la carte de contrôle (**Figure 2.15**) et en excluant la valeur aberrante, les résultats de mesure de pénétrométrie sont répétables dans la gamme de mesure et pour le gel de gélatine utilisé. A noter que les 36 valeurs mesurées ont été regroupées en 6 groupes de 6 valeurs, afin d'en calculer les 6 moyennes qui sont représentées par les différents points sur la carte de contrôle (**Figure 2.15**).

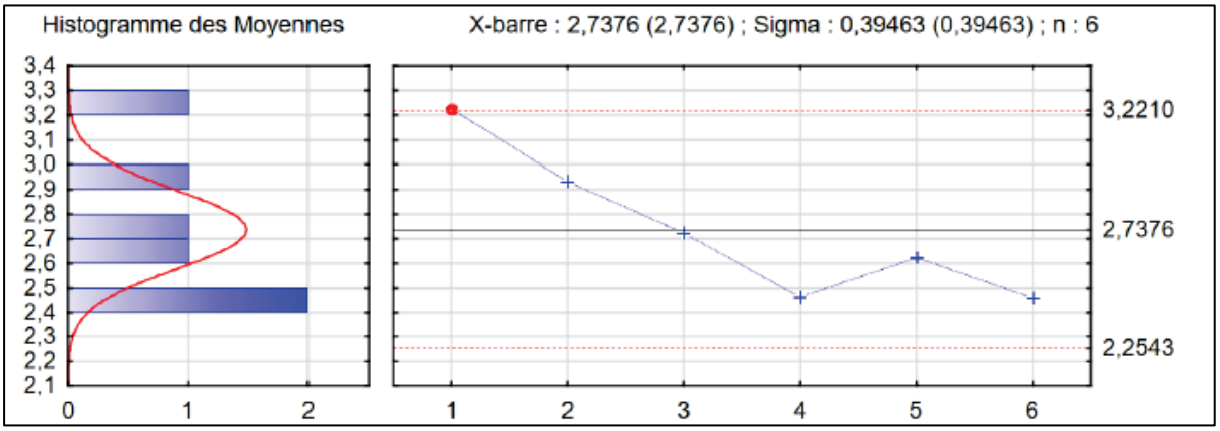


Figure 2.15. *Evaluation de la répétabilité des mesures de pénétration avec la sonde de 2 mm de diamètre dans des gels de gélatine de 90 mm de diamètre. Représentation sous la forme d'une carte de contrôle.*

2.3.1.2.2. Mesures au spectrophotomètre d'absorption moléculaire UV-visible

Comme indiqué en section 2.1.6.2, Fu et al. (2019 ; Wang et al. (2020) et Stevenson et al. (2020) ont suivi l'extension de la réticulation, en fonction des conditions réactionnelles, à deux longueurs d'onde : 294 et 420 nm. Pour rappel, une augmentation de l'absorbance à 294 nm serait due à la formation de composés incolores lors de la phase précoce de la glycation, tandis qu'un pic à 420 nm indiquerait la formation de mélanoïdines (composés bruns). La lecture des absorbances à ces longueurs d'onde a nécessité des mises au point expérimentales pour entrer dans la gamme de mesure du spectrophotomètre. A noter que ces expérimentations avaient pour but de vérifier les données de la littérature, afin d'évaluer le suivi de l'avancement de la glycation.

Plusieurs conditions opératoires ont été testées afin d'obtenir différents niveaux d'avancement de la réaction (50, 70 et 90 °C ; 90 et 180 min ; 3, 5, 7 % de ribose ; pH 7, 8 et 9). La **Figure 2.16** présente les spectres obtenus, en fonction du facteur de dilution de la solution contenant le gel glyqué, pour les conditions suivantes : 70 °C, 90 min, 5 % de *D*-ribose et pH 9. L'absorbance maximale se situe entre 280 et 292 nm, avec donc un décalage par rapport à la littérature. Ce pic est visible sur la **Figure 2.16**.

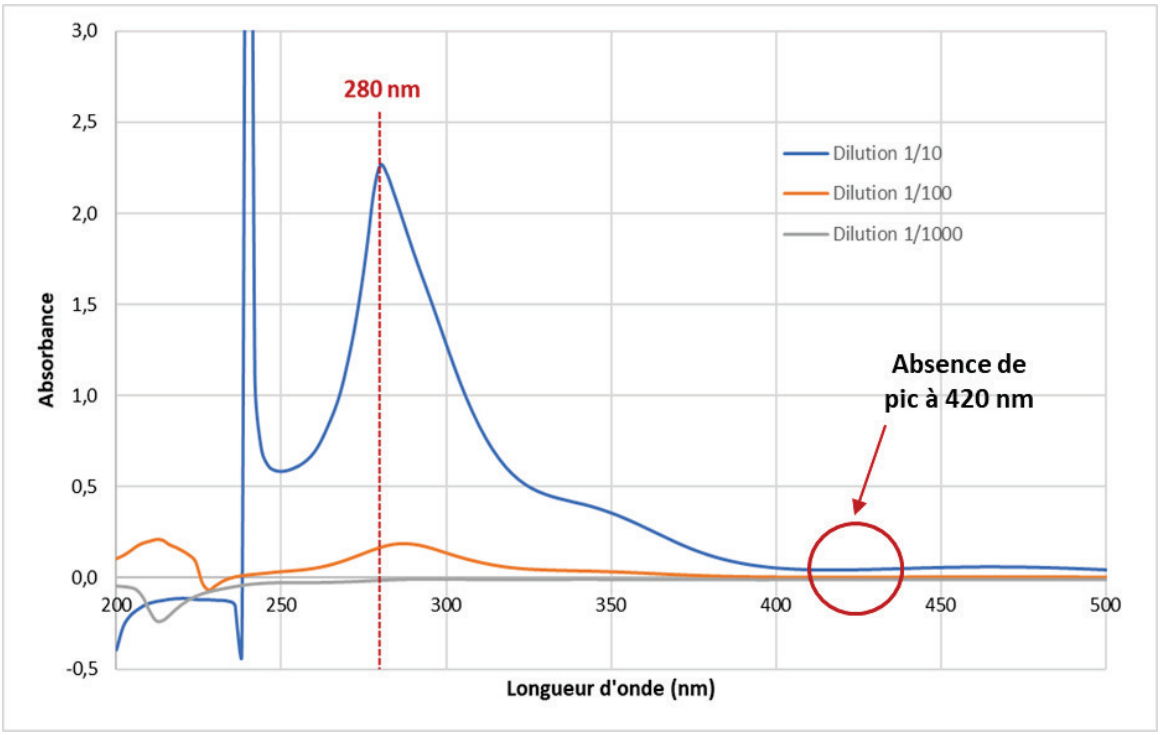


Figure 2.16. *Exemple de spectres d'absorption obtenus dans le cas de gels de gélatine glyqués à 70 °C, pendant 90 min, avec une concentration de 5 % en D-ribose et à pH 9.*

Les graphiques de la **Figure 2.17** montrent clairement un effet de la concentration en *D*-ribose

(**Figure 2.17a-f**), de la température et du temps réactionnel sur l'intensité du pic situé vers 294 nm, prouvant qu'il s'agit bien de composés issus de la glycation. Cependant, le pic à 420 nm n'est apparu pour aucune des conditions testées. Afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'un problème expérimental, des conditions réactionnelles plus poussées ont été mises en œuvre (chauffage jusqu'à 130 °C, pendant 3 h) (**Figure 2.17g**). Le pic associé à la présence des mélanoïdines n'a jamais été observé, contrairement aux travaux de (Stevenson et al., 2020).

L'absence du second pic à 420 nm nous prive d'un élément essentiel quant à l'avancement de la réaction. Ceci nous amène à douter de l'intérêt de cette méthode pour évaluer la glycation dans les conditions opératoires de ce travail. Elle reste néanmoins utile pour discriminer les différents paramètres réactionnels dans ses premiers stades.

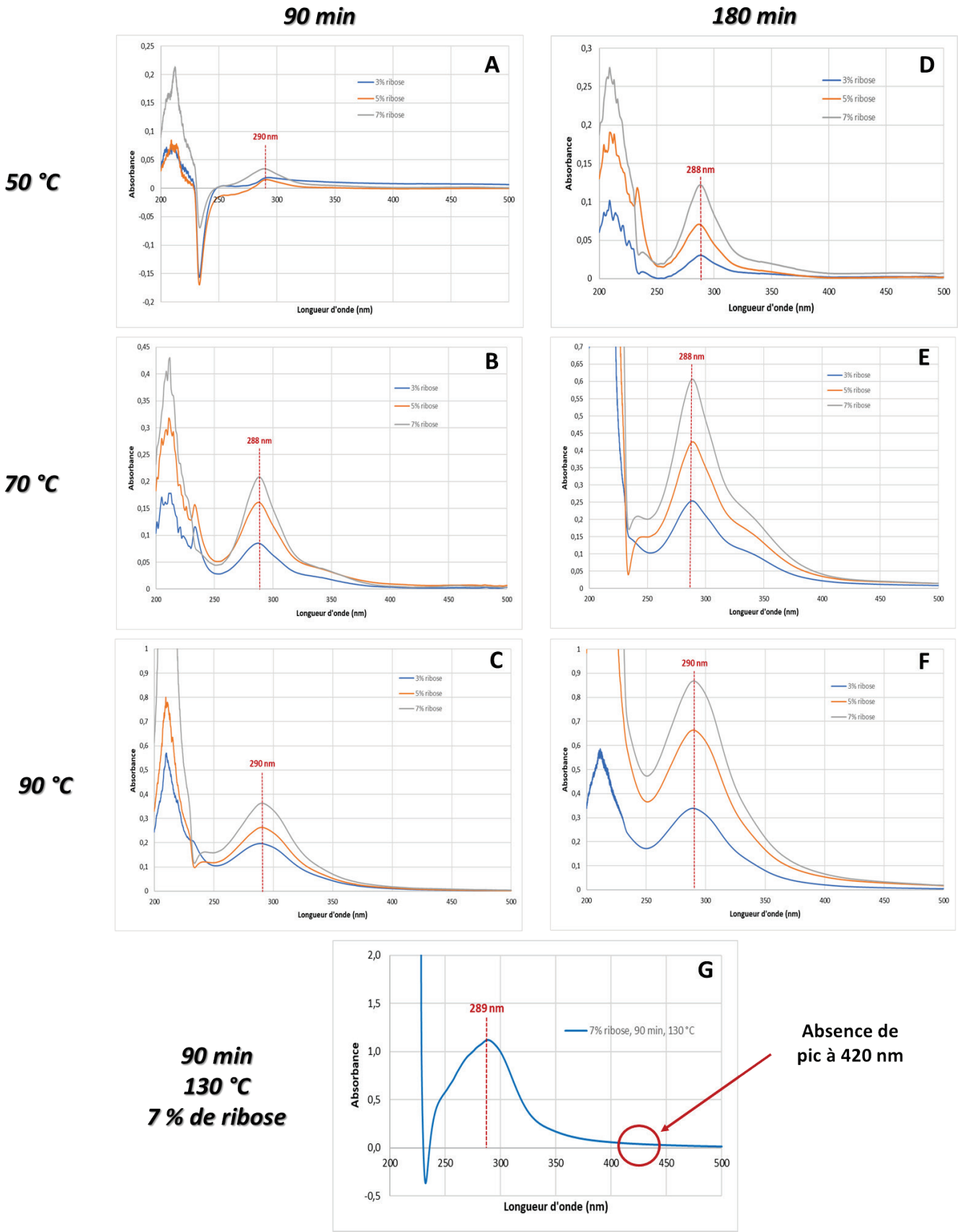


Figure 2.17. *Spectres d'absorption de gels de gélatine glyqués en fonction de la durée et des températures réactionnelles. A-C – Spectres obtenus à 50, 70 et 90 °C au bout de 90 min de réaction ; D-E - Spectres obtenus à 50, 70 et 90 °C au bout de 180 min de réaction ; G – condition la plus poussée : 130 °C ; 90 min et 7% de D-ribose.*

La **Figure 2.18** synthétise les résultats obtenus et confirme l'effet de la durée, de la température et de la concentration en *D*-ribose sur l'augmentation de l'absorbance[16].

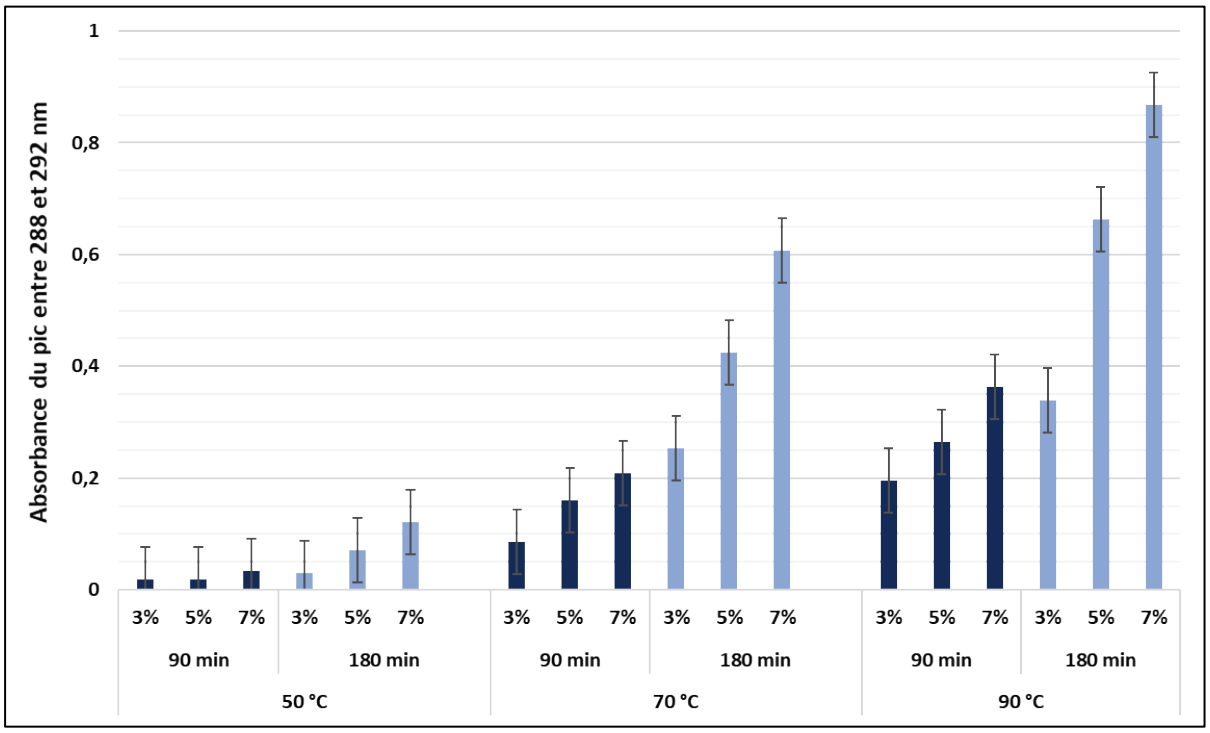


Figure 2.18. *Récapitulatif des absorbances maximales entre 288 et 292 nm en fonction de la concentration en D-ribose, de la durée et de la température réactionnelle. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

2.3.1.3. Choix des paramètres réactionnels (pH, température et concentration en D-ribose) de la glycation

Dans la littérature, les concentrations en glucides utilisées varient d'une étude à l'autre. Afin de rester dans une gamme acceptable d'un point de vue nutritionnel et après des essais de texture et de mesure d'absorbance, il s'est avéré qu'une concentration de 5 % en *D*-ribose était satisfaisante. Ce choix est à la fois basé sur des mesures expérimentales, mais également sur la facilité de manipulation des gels après glycation. En effet, à partir d'une concentration de 7 % en *D*-ribose, la viscosité des gels les rendait difficilement manipulables.

La concentration en glucide présent dans le milieu réactionnel doit donc être un compromis entre plusieurs facteurs afin :

[16] *N.B* : le faible nombre de données n'a pas permis d'effectuer des analyses statistiques. Les interprétations sont donc basées, de façon qualitative, sur le chevauchement des barres d'erreur correspondants à l'erreur standard à la moyenne.

- D'obtenir une réaction détectable ;
- D'assurer le bon déroulement de la réaction pendant une durée définie (ici, 180 min) ;
- D'avoir des doses de glucides compatibles avec une alimentation équilibrée ;
- D'éviter un phénomène de caramélisation trop poussé qui impacterait fortement la viscosité du milieu réactionnel.

Le pH joue un rôle majeur dans le déroulement de la réaction de glycation, il est donc nécessaire de tamponner correctement le milieu. Trois tampons ont été utilisés : 7, 8 et 9, afin d'évaluer le pH optimum de la réaction. Des pH plus élevés auraient pu être testés et auraient probablement conduits à des résultats intéressants, mais cela nous semblait trop éloigné des caractéristiques classiques des aliments. Outre le pH du milieu réactionnel, son pouvoir tampon est fondamental. En effet, lors de la réaction de *N*-glycation, notamment au niveau des Lysines, un relargage de protons (H^+) a lieu, avec pour conséquence une acidification du milieu. Les essais réalisés avec les tampons PBS ou Tris à 0,1 M montrent qu'il n'est pas possible de maintenir constant la valeur du pH pendant la durée réactionnelle[17] (**Figure 2.19**)

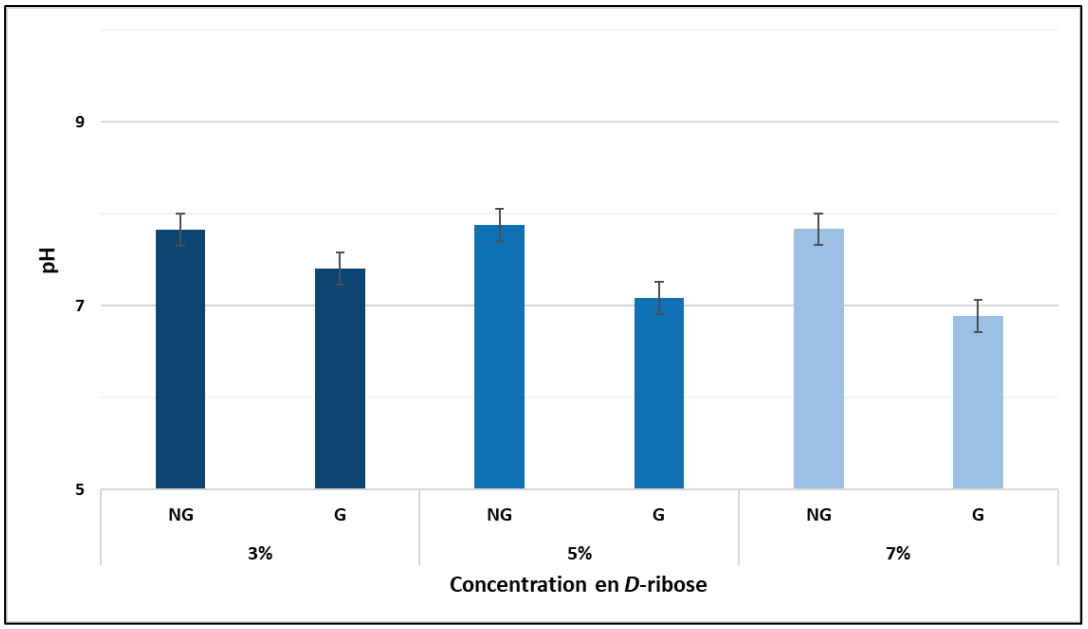


Figure 2.19. *Valeurs de pH du milieu réactionnel avant et après acidification par la glycation, en fonction de la concentration en D-ribose. Exemple du tampon Tris pH 9. Conditions de glycation : 90 °C, 180 min pour une gélatine d'indice Bloom 200. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

[17] *N.B* : le faible nombre de données n'a permis d'effectuer des analyses statistiques. Les interprétations sont donc basées, de façon qualitative, sur le chevauchement des barres d'erreur correspondants à l'erreur standard à la moyenne.

Une diminution du pH est mesurée avec les tampons préparés à 0,1 M. Cette diminution s'intensifie avec la concentration en *D*-ribose (de 0,42 à 0,95 pour des concentrations en *D*-ribose comprises entre 3 et 5 %). Les échantillons ont été volontairement incubés à 90 °C, afin d'obtenir une réaction poussée et maximiser les effets sur le pH. Une concentration en tampon de 1 M permet de limiter cette diminution à l'erreur de mesure, comme indiqué sur la **Figure 2.20**.

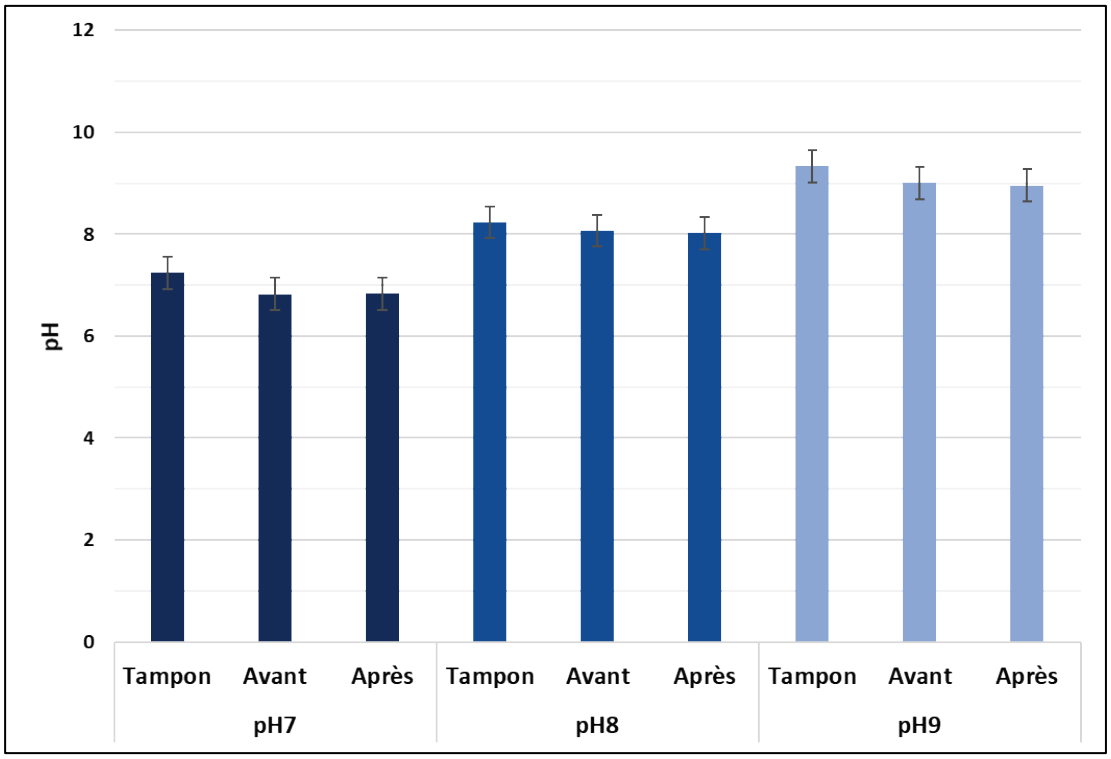


Figure 2.20. *Valeurs de pH du tampon Tris et du milieu réactionnel avant et après glycation, pour une concentration en D-ribose de 5 % et une durée de 90 min, à 50 °C. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

La **Figure 2.21** montre l'effet du pH sur la force maximale mesurée par le texturomètre, après glycation, mettant en évidence un effet net du pH sur ce paramètre. Un gel tamponné à pH 9 est 2,1 fois plus résistants qu'à pH 7 et 1,5 fois qu'à pH 8, après réaction à 50 °C. Cette différence de pH s'observe pour deux températures réactionnelles différentes (50 et 70 °C). Selon la **Figure 2.21**, le tampon le plus favorable, c'est-à-dire celui qui permet d'atteindre le pH le plus élevé (et de le maintenir) est le tampon Tris pH 9. A noter qu'un pH élevé est relativement peu fréquent en agro-alimentaire. Pour la plupart, les aliments ont des pH acides ou proches de la neutralité. Seuls quelques produits céréaliers ou de la mer peuvent atteindre un pH de 8. Pour les aliments à base de viande, le maintien d'un pH élevé sera difficile à réaliser, des solutions devront donc être trouvées.

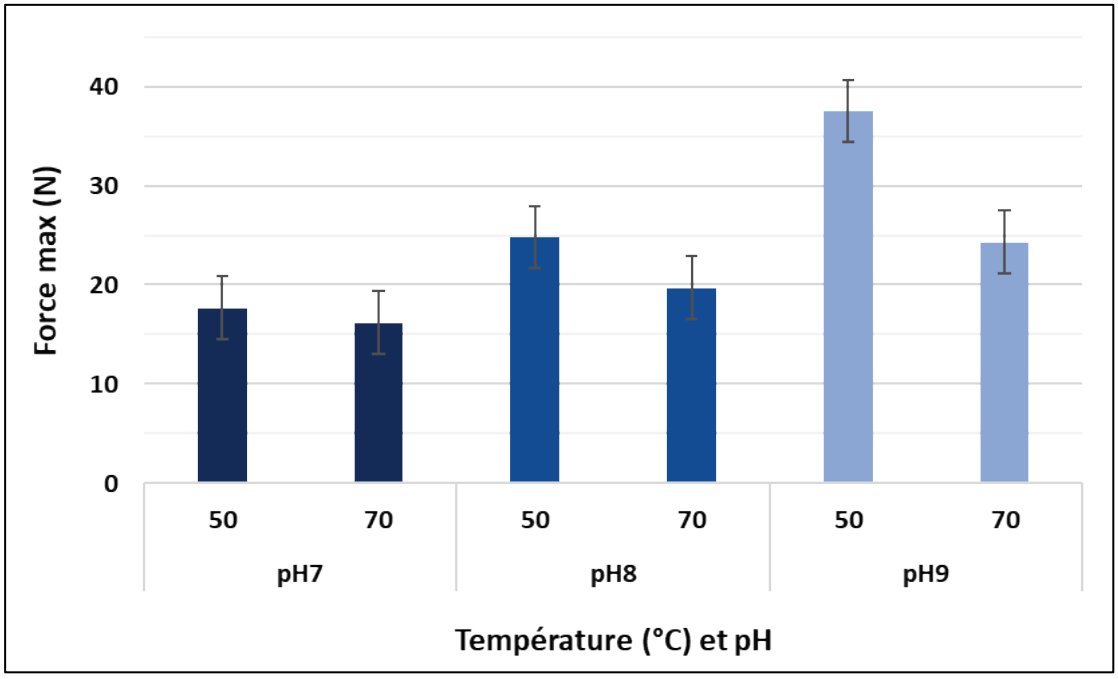


Figure 2.21. *Force maximale du gel mesuré au texturomètre en fonction du pH et de la température réactionnelle, avec 5 % de D-ribose. Préparation avec du tampon Tris 1 M. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

Concernant le choix de la température réactionnelle, l'analyse des **Figure 2.17** et **Figure 2.18**, conduit à des résultats contradictoires. L'absorbance entre 288 et 292 nm, reflétant l'apparition de composés incolores lors de la phase précoce de la glycation, augmente en fonction de la température, ce qui est largement admis dans la littérature. Mais, si nous nous basons sur les mesures de force maximale par compression (**Figure 2.21**), un effet température entre 50 et 70 °C est clairement visible. D'après la **Figure 2.22**, une température de 50 °C permet d'obtenir les gels les plus résistants après glycation. Cette résistance s'accroît aussi en fonction du pH.

Au final, compte tenu de tous ces résultats préliminaires, une température de 50 °C, un pH de 9 et une concentration en *D*-ribose de 5 % ont été choisis pour l'ensemble des expérimentations destinées à comprendre les effets de la teneur en eau et de l'indice Bloom sur le déroulement de la réaction de glycation dans un gel de gélatine.

2.3.2. Caractérisation de l'effet de la réaction de glycation et des conditions réactionnelles sur la structure de la gélatine par une approche multidisciplinaire

2.3.2.1. Approche colorimétrique

Les résultats des mesures de colorimétrie sont présentés dans le **Tableau 2.11**. Seul l'indice de jaune (b*) est dépendant du degré Bloom des gélatines. Cela peut s'expliquer par la couleur jaune des poudres de gélatine qui peut varier d'un lot à l'autre, selon le procédé de fabrication. La glycation réduit la luminance (L*) des échantillons secs (S), mais n'affecte pas celle des échantillons humides (H). Après glycation, les indices de rouge (a*) et de jaune (b*) augmentent significativement pour les échantillons H et S, avec, pour conséquence, un ΔE* presque 3 fois plus élevé pour les conditions S que pour les conditions H. Les valeurs de ΔE* (Eq. 2.3) sont supérieures à 11,0. Or, selon Hernandez Saluena, Saenz Gamasa, Dineiro Rubial & Alberdi Odriozola (2019), un ΔE*≥2 est perceptible par l'œil humain (**Figure 2.22**).

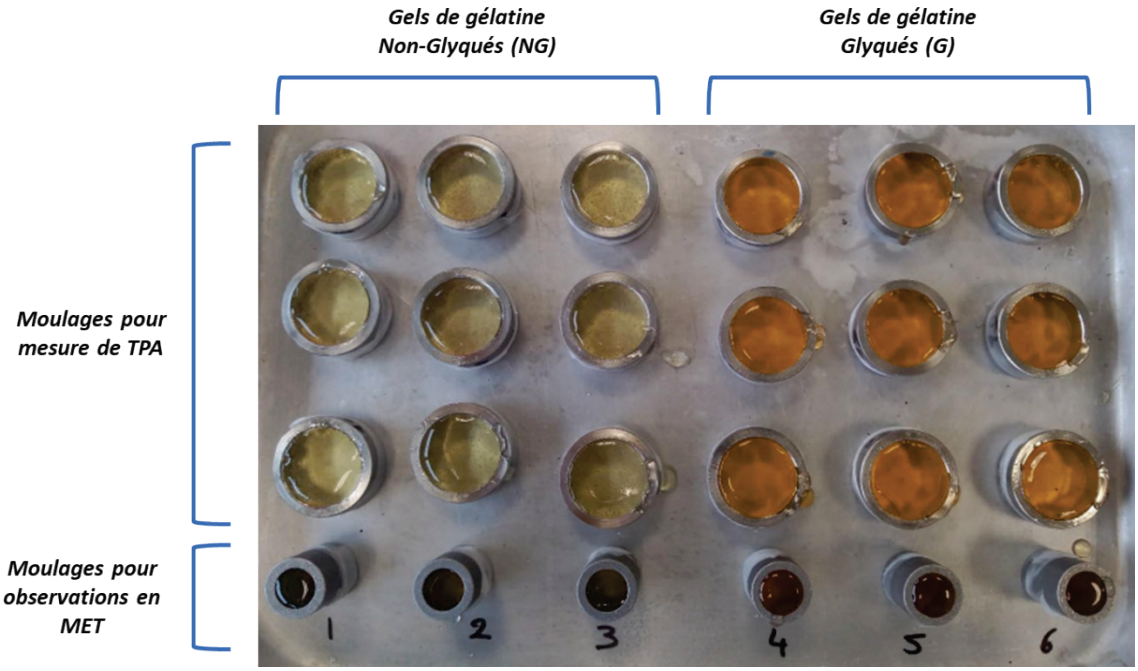


Figure 2.22. *Différences de couleur observables entres des gels de gélatine non-glyqués (NG) et glyqués (G). Exemple de la gélatine d'indice Bloom 125 pour les conditions réactionnelles suivantes : 180 min à 50 °C, 5 % de D-ribose, pH 9.*

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Etxabide et al. (2017) qui ont mis en évidence que les échantillons glyqués (G) présentaient une couleur significativement plus foncée

comparativement aux échantillons non-glyqués (NG), signifiant que la réaction de glycation a bien eu lieu en présence de *D*-ribose. Il a été montré que cet assombrissement de la couleur était indépendant de la concentration en gélatine et était associé à une augmentation de la réticulation du gel qui pourrait être une conséquence de la glycation (Stevenson et al., 2020). Etxabide, Kilmartin, Maté, Prabakar, Brimble & Naffa (2021) ont attribué la diminution de L* dans la gélatine supplémentée en glucide à l'absorption de la lumière par les intermédiaires réactionnels (par exemple, 1-désoxyribosone et 3-désoxyribosone) et par les mélanoïdines produites au cours des dernières étapes de la réaction (Zhan et al., 2020). Seules les valeurs de L* obtenues à partir des échantillons de gélatine sèche (S) ont diminué de manière significative (décalage vers le noir), alors que les échantillons de gélatine humide (H) n'ont montré aucun changement de luminance (**Tableau 2.11**). Cela pourrait signifier une plus faible présence d'intermédiaires réactionnels et/ou de mélanoïdines dans la condition H. Ces résultats indiquent donc clairement que la teneur en eau initiale de la poudre de gélatine influence les propriétés colorimétriques du gel et a un impact sur la réaction de glycation.

Tableau 2.11. *Mesures de couleur obtenues au moyen d'un spectrocolorimètre sur des gels préparés avec des gélatines de différents degrés Bloom (B) et teneurs en eau initiales. Deux valeurs moyennes (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test à plages multiples de Tukey (P > 0,05). Les comparaisons ont été faites dans les colonnes de même couleur.*

	***D*-ribose**	**L***	**a***	**b***	**ΔE***
B125 NG *(n=18)*	**Non**	54,4± 0,7^{a}	-0,3±0,2^{a}	24,1±0,8a	/
B200 NG *(n=18)*		54,7±0,7^{a}	-0,8±0,1^{a}	20,8±0,9b	/
B125 G *(n=18)*	**Oui**	48,8±1,2^{b}	13,7±1,5^{b}	40,9±2,1^{c}	22,5
B200 G *(n=18)*		49,0±1,1^{b}	13,8±1,6^{b}	40,2±2,3^{c}	24,9
B125 S G *(n=9)*	**Oui**	44,5± 0,6^{c}	19,6± 0,3^{c}	48,9±1,1^{d}	33,3
B125 H G *(n=9)*		53,1± 0,9^{a}	7,8±0,6^{d}	32,8±1,0^{e}	11,9
B200 S G *(n=9)*		44,8± 0,4^{c}	20,1±0,2^{c}	49,5±0,2^{d}	36,8
B200 H G *(n=9)*		53,2± 0,7^{a}	7,5±0,6^{d}	30,9±0,7^{e}	13,2

2.3.2.2. Approche protéomique

2.3.2.2.1. Hydrolyse enzymatique

Comme indiqué précédemment, une hydrolyse enzymatique de la gélatine est requise préalablement aux analyses de spectrométrie de masse (MS), de façon à fragmenter suffisamment les protéines. La méthode d'hydrolyse enzymatique est décrite en section 2.2.2.4.1, ainsi qu'en

Annexe S 2.2. L'hydrolyse a été évaluée, en première intention, au moyen de la méthode rapide, Direct Detect® (**Tableau 2.12**) (*cf*. 2.2.2.4.1), puis une identification des protéines a été faite par MS.

Tableau 2.12. *Dosage des protéines dans des gels de gélatine glyqués ou non par la méthode Direct Detect®, après 21h de digestion enzymatique (résultats exprimés en mg.mL^{-1}).*

	Trypsine	Chymotrypsine	Collagénase type I
Gels non-glyqués	8,1	9,6	13,3
Gels glyqués	5,8	9,1	11,7

D'après ces résultats, la collagénase de type I est l'enzyme pour laquelle le plus grand nombre de peptides est dosé, quelle que soit la condition testée. Ce dosage confirme que l'hydrolyse a bien eu lieu.

D'après les données du **Tableau 2.13**, la trypsine permet d'obtenir un plus grand nombre de peptides. La protéine majoritaire dans les gels est le collagène de type 1 chaine alpha 1 (*cf*. 2.3.2.2.3). De plus, les résultats concernant les différents temps d'incubation (5 et 21 h) ont révélé une présence plus importante de peptides dans la condition correspondant à 21 h d'incubation.

Tableau 2.13. *Nombre de peptides obtenus après hydrolyse enzymatique de gels de gélatine glyqués (Bloom 200), par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), à partir de la protéine majoritaire (Collagène de type I chaîne alpha 1) ou des protéines totales.*

Enzymes	Nombre de peptides appartenant au collagène type I chaîne alpha 1	Nombre total de peptides
Trypsine	34	84
Chymotrypsine	1	1
Collagénase type I	29	64

Sur la base de ces résultats, la trypsine a été choisie car permettant d'obtenir un plus grand nombre de peptides à partir du collagène de type I chaîne alpha 1 (protéine majoritaire). A noter qu'une partie des peptides glyqués ont pu être perdus au cours de l'étape de purification (**Annexe S 2.2**), où le seuil de coupure était fixé à 5 kDa.

2.3.2.2.2. Analyse par Maldi-TOF/TOF

Cette technique permet de doser un composé et d'en identifier la composition grâce au rapport masse/charge d'ions. Les spectres obtenus, avec ou sans dénaturation thermique, présentent toujours une absence de protéines au-delà de 10 kDa, alors que le collagène est une protéine de haut poids moléculaire. Une explication possible serait que les plus grosses protéines ont, en réalité, un poids

moléculaire trop élevé pour parcourir le tube de vol. Elles resteraient donc sur la plaque sans être détectées par l'analyseur (**Figure 2.23**).

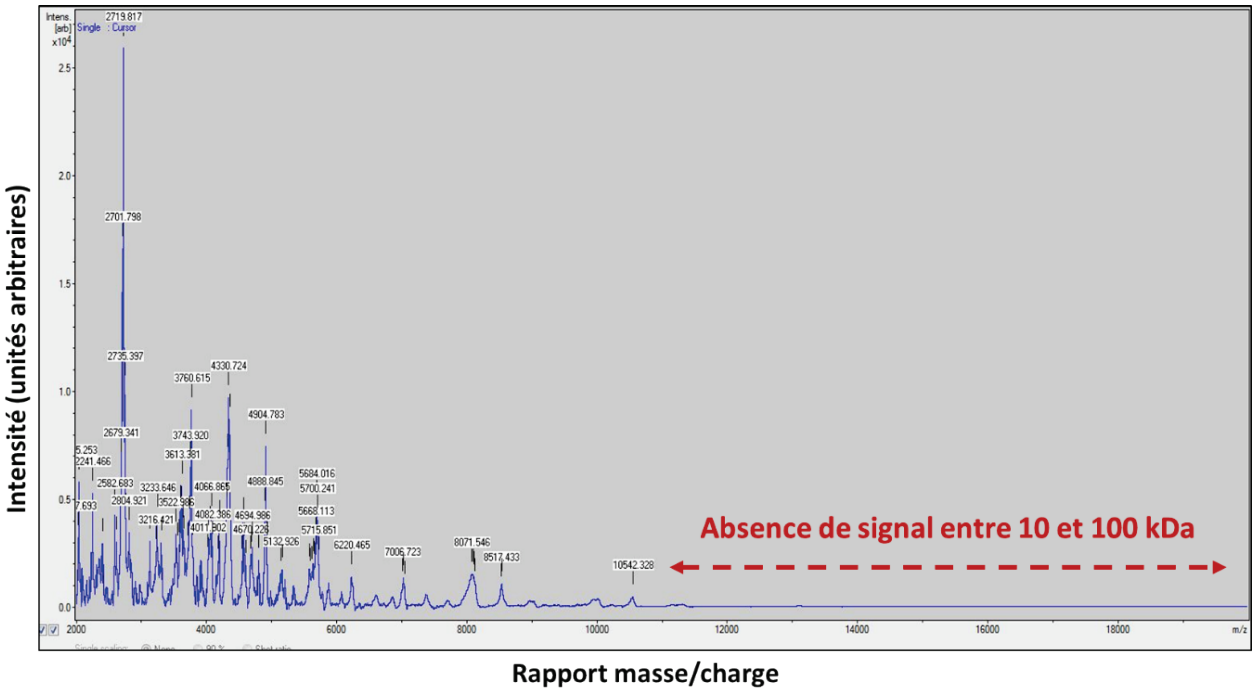


Figure 2.23. *Spectre Maldi-TOF/TOF d'un gel de gélatine glyqué (indice Bloom 200), sans hydrolyse enzymatique préalable.*

Après hydrolyse enzymatique, un signal de faible intensité apparaît (**Figure 2.24ab**). Le spectre représenté en bleu (condition de glycation à 50 °C et 3 % de *D*-ribose) a l'intensité la plus forte, mais celle-ci reste, en réalité, très faible comparativement à celle du calibrant peptidique. L'intensité des spectres s'apparente alors à du bruit et ne permet pas d'interroger correctement les bases de données. Ainsi, aucun score significatif n'a été obtenu à la suite de l'interrogation des bases de données (Algorithme MASCOT) à partir de la liste regroupant la masse des pics. Aucune identification de peptides n'a été possible. De ce fait, des analyses en LC-MS/MS ont été mises en œuvre (*cf*. 2.3.2.2.3).

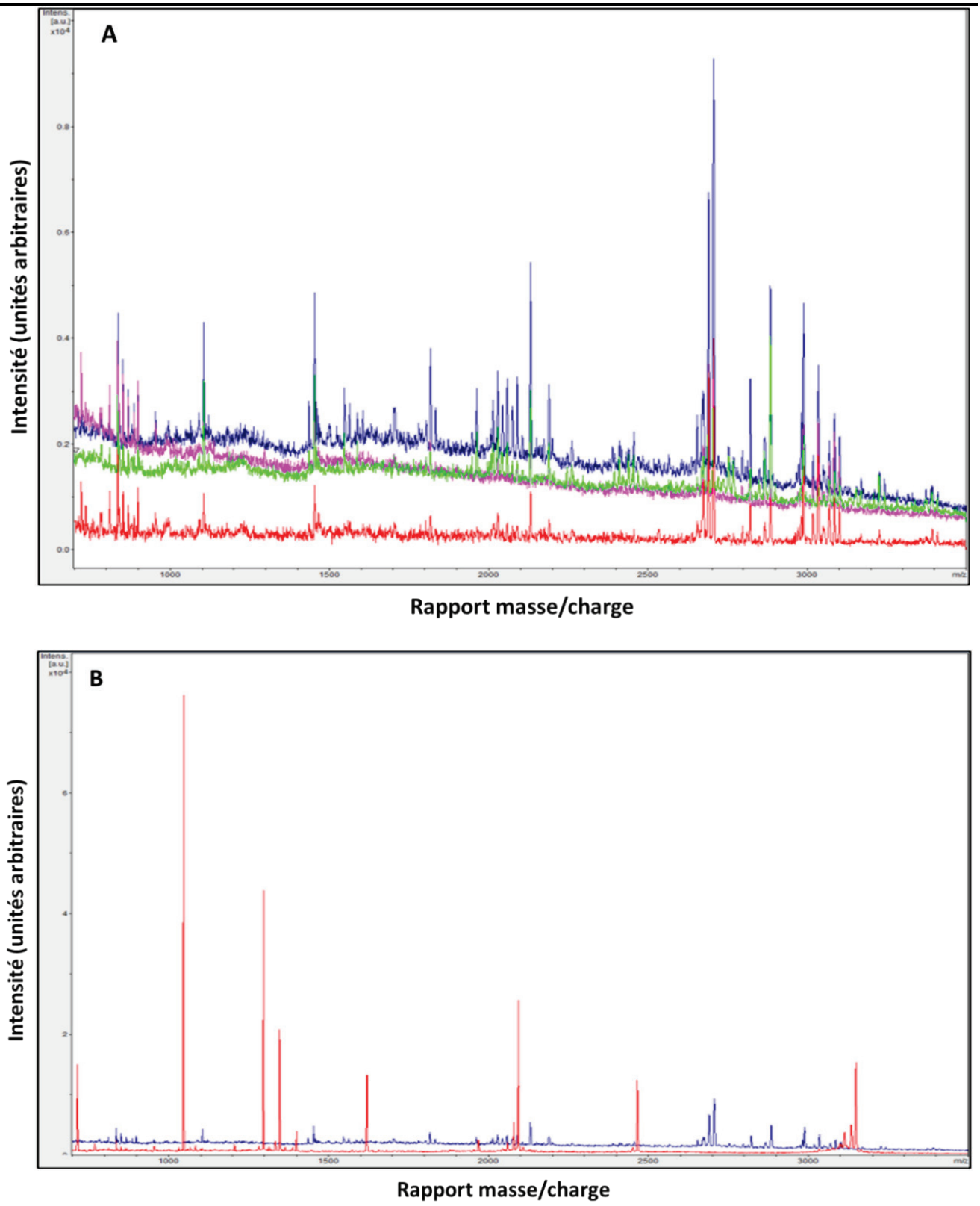


Figure 2.24. *A – Spectres Maldi-TOF/TOF en mode réflectron, obtenus après hydrolyse enzymatique à la trypsine de gels de gélatine : 90 °C sans D-ribose (en rouge), 90 °C avec 3 % de D-ribose (en vert), 50 °C sans D-ribose (en rose), 50 °C avec 3 % de D-ribose (en bleu). B – Spectres représentant l'intensité du calibrant peptidique (en rouge) et de la condition 50 °C 3 % de D-ribose (en bleu).*

2.3.2.2.3. Analyse par LC-MS/MS

Les résultats de cette analyse indiquent que les trois protéines les plus représentées dans nos échantillons sont les suivantes :

- Collagen type I, alpha 1 chain (Gene name: COL1A1)
- Collagen type I, alpha 2 chain (Gene name: COL1A2)
- Collagen alpha-1(III) chain preprotein (Gene name: COL3A1)

La chaîne alpha 1 du collagène de type I est la principale protéine présente dans les tissus conjonctifs, tels que la peau animale. L'analyse des séquences a permis d'identifier la formation de conjugués entre le *D*-ribose et des acides aminés. La **Figure 2.25** montre que le *D*-ribose s'est lié préférentiellement aux résidus Sérine et de Thréonine du collagène de type I. Il s'agit donc d'une réaction de *O*-glycation car elle a eu lieu au niveau des groupements hydroxyles des acides aminés (Sun et al., 2021) (**Figure 2.4**), à la différence de la réaction de *N*-glycation, communément décrite dans la littérature, qui se produit au niveau des groupes amines (**Figure 2.3**). Indépendamment de l'ose simple présent ou de la matrice utilisée, la réaction de *N*-glycation a notamment lieu au niveau des Lysines et des Arginines (Liu et al., 2012 ; Wang et al., 2013), et aboutit à la formation de composés appelés bases de Schiff. Poulsen et al. (2013) ont suggéré que diverses fonctions amines provenant d'acides aminés pouvaient réagir avec les groupes carbonyles des glucides réducteurs, des lipides oxydés, de la vitamine C ou des quinones. Au cours de la glycation, les amines primaires ont un degré de réactivité plus élevé que les amines secondaires, les amines tertiaires ayant une réactivité nulle. En outre, Poulsen et al. (2013) ont constaté que le groupe amine primaire présent dans les chaînes latérales de Lysine était le plus réactif, suivi par l'Arginine et les groupes *N*-terminaux présents. Cependant, d'après les résultats préliminaires obtenus par LC-MS/MS, sur de la gélatine B200, il apparaît que :

1) Des liaisons covalentes (formation de conjugués) ont eu lieu entre le *D*-ribose et les résidus Sérine and Thréonine (**Figure 2.25**) et, que ces interactions sont intervenues au niveau des groupements hydroxyles (réaction de *O*-glycation). Ce type de réaction a déjà a été mis en évidence sur de l'albumine en association avec du dextrane (Sun et al., 2021). Des augmentations de poids moléculaire sur la Sérine et la Thréonine de 203 Da et 16 Da, respectivement, ont été mesurées. Ceci suggère également que le nombre de peptides glyqués dans les conjugués ovalbumine-dextrane a augmenté de façon significative, ce qui

signifierait que la molécule d'ovalbumine s'est dépliée lors de la glycation, probablement du fait de la température réactionnelle élevée (90 °C) ;

2) Les interactions de réaction de *O*-glycation mises en évidence ci-dessus, à la place des réactions de *N*-glycation habituellement rencontrées, peuvent s'expliquer par le fait que les résidus Lysine et Arginine ont pu être impliqués dans d'autres liaisons covalentes, issues de réactions de glycation ayant eu lieu lors du procédé d'extraction de la gélatine. Ces liaisons pouvant impliquer des glucides résiduels autres que le *D*-ribose, ou des lipides oxydés présents dans la gélatine (Duconseille, Gaillard, Santé-Lhoutellier & Astruc, 2018 ; Zamora & Hidalgo, 2005) ;

3) La plupart des gélatines sont structurées sous forme cristalline (triple-hélice) ou amorphe (bobine aléatoire), mais les télopeptides (régions terminales courtes qui ne forment pas de triple-hélice) peuvent être connectés par des liaisons transversales impliquant la Lysine (Ahmad et al., 2018), ce qui limite leur disponibilité pour la glycation ;

4) La glycation au niveau de la Lysine et de l'Arginine n'a pas été observée, car la trypsine n'aurait hydrolysé que partiellement la gélatine glyquée. Seules les réactions sur les acides aminés considérés comme secondaires pour la glycation, la Sérine et la Thréonine, ont été mises en évidence. Ce point demeure à vérifier.

[1]MFSFVDLRLL LLLAATALLT HGQEEGQEEG QQGQEEDIPP VTCVQNGLRY HDRDVWKPVP CQICVCDNGN VLCDDVICDE IKNCPSARVP AGECCPVCPE
GEVSPTDQET TGVEGPKGDT GPRGPRGPSG PPGRDGIPGQ PGLPGPPGPP GPPGPPGLGG NFAPQLSYGY DEKSAGISVP GPMGPSGPRG LPGPPGAPGP
QGFQGPPGEP GEPGASGPMG PRGPPGPPGK NGDDGEAGKP GRPGERGPPG PQGARGLPGT AGLPGMKGHR GFSGLDGAKG DAGPAGPKGE PGSPGENGAP
GQMGPRGLPG ERGRPGPPGP AGARGNDGAT GAAGPPGPTG PAGPPGFPGA VGAKGEAGPQ GARGSEGPQG VRGEPGPPGP AGAAGPAGNP GADGQPGGKG
ANGAPGIAGA PGFPGARGPS GPQGPSGPPG PKGNSGEPGA PGSKGDTGAK GEPGPTGVQG PPGPAGEEGK RGARGEPGPA GLPGPPGERG GPGSRGFPGA
DGVAGPKGPA GERGSPGPAG PKGSPGEAGR PGEAGLPGAK GLTGSPGSPG PDGKTGPPGP AGQDGRPGPP GPPGARGQAG VMGFPGPKGA AGEPGKAGER
GVPGPPGAVG PAGKDGEAGA QGPPGPAGPA GERGEQGPAG SPGFQGLPGP AGPPGEAGKP GEQGVPGDLG APGPSGARGE RGFPGERGVQ GPPGPAGPRG
ANGAPGNDGA KGDAGAPGAP GSQGAPGLQG MPGERGAAGL PGPKGDRGDA GPKGADGAPG KDGVRGLTGP IGPPGPAGAP GDKGETGPSG PAGPTGARGA
PGDRGEPGPP GPAGFAGPPG ADGQPGAKGE PGDAGAKGDA GPPGPAGPTG PPGPIGSVGA PGPKGARGSA GPPGATGFPG AAGRVGPPGP SGNAGPPGPP
GPAGKEGSKG PRGETGPAGR PGEAGPPGPP GPAGEKGSPG ADGPAGAPGT PGPQGIAGQR GVVGLPGQRG ERGFPGLPGP SGEPGKQGPS GPSGERGPPG
PMGPPGLAGP PGESGREGAP GAEGSPGRDG APGPKGDRGE SGPAGPPGAP GAPGAPGPVG PAGKSGDRGE TGPAGPAGPV GPVGARGPAG PQGPRGDKGE
TGEQGDRGIK GHRGFSGLQG PPGPPGSPGE QGPSGASGPA GPRGPPGSAG APGKDGLNGL PGPIGPPGPR GRTGDAGPVG PPGPPGPPGP PGPPSGGFDF
SFLPQPPQEK AHDGGRYYRA DDANVVRDRD LEVDTTLKSL SQQIENIRSP EGSRKNPART CRDLKMCHSD WKSGEYWIDP NQGCNLDAIK VFCNMETGET
CVYPTQPSVP QKNWYISKNP KDKRHVWYGE SMTDGFQFEY GGEGSDPADV AIQLTFLRLM STEASQNITY HCKNSVAYMD QQTGNLKKAL LLQGSNEIEI
RAEGNSRFTY SVIYDGCTSH TGAWGKTVIE YKTTKTSRLP IIDVAPLDVG APDQEFGIDL SPVCFL[1466]

Figure 2.25. *Carte protéomique correspondant à un gel de gélatine d'indice Bloom 200 préparé à partir de gélatine en poudre. Les acides aminés qui ont réagi avec le D-ribose pour former des conjugués par O-glycation sont colorés en bleu.*

2.3.2.3. Caractérisation ultra-structurale

Les images a, b, d et e de la **Figure 2.26**, qui correspondent aux conditions « témoins » sans *D*-ribose (NG), révèlent une différence notable dans l'ultrastructure des gels en fonction de leur indice Bloom (B125 *vs*. B200). Pour ces échantillons (NG), que ce soit dans la condition initiale S (2,68 kg_{eau}/kg_{MS}, **Figure 2.26a-c**) ou H (3,74 kg_{eau}/kg_{MS}, **Figure 2.26d-f**), l'ultrastructure du gel est homogène pour la gélatine B125 (**Figure 2.26ad**), mais apparaît plus hétérogène, en ayant l'apparence d'un réseau ou d'un maillage pour la gélatine B200 (**Figure 2.26bcef**). Etxabide et al. (2015) ont fait des observations similaires à des grossissements identiques par microscopie à force atomique sur des gels de gélatine de poisson. Ils ont suggéré que ces structures hétérogènes, qualifiées de « fibrillaires », correspondaient aux structures en triple-hélice présentes dans la gélatine. Nous pensons que les structures hétérogènes observées ici dans la gélatine B200 pourraient également être attribuées à des triple-hélices, ou à des faisceaux de triple-hélice (également appelés agrégats), qui dépendraient :

- Du poids moléculaire (chaîne protéique plus longue). Il a, en effet, été montré que les gels avec des valeurs d'indices Bloom élevées présentaient davantage de structures en triple-hélice et de chaînes protéiques enchevêtrées, de poids moléculaire élevé (Kuai et al., 2020) ;
- Du processus utilisé pour extraire la gélatine des peaux de porc (Cheng, Wang, Zhang, Zhai & Hou, 2021 ; Netter et al., 2020).

Néanmoins, dans le cas de la gélatine B200, nous postulons que les agrégats observés en l'absence de *D*-ribose (NG) peuvent résulter du fait que le pH de la réaction, ici fixé à 9, a favorisé la glycation, mais aussi modifié la charge globale de la gélatine (le point isoélectrique pour une gélatine de type A est compris entre 7 et 9). La gélatine sera alors chargée négativement et les interactions électrostatiques entre molécules voisines favoriseront la formation d'hélices (Pulidori et al., 2023). Un indice Bloom élevé (200 *vs*. 125), du fait de la présence de chaînes protéiques plus longues pouvant potentiellement entraîner une augmentation des interactions électrostatiques, favoriserait donc la formation d'agrégats, y compris en condition NG. En conséquence, cela limiterait les interactions possibles entre la gélatine et les composés ajoutés. Il a également été montré que l'ajout d'une molécule influençait la structure du gel. En effet, les groupes hydroxyles et amines des molécules de polyphénols et des nanoparticules chargées en chitosane (polyoside) peuvent former des liaisons hydrogène avec les chaînes de gélatine et, ainsi interférer avec une structure en triple-hélice. Alouffi, Khanam, Husain, Akasha, Rabbani & Ahmad (2022) ont confirmé la modification de la structure des protéines (fibrinogène) lors de la liaison du *D*-ribose. Dans notre cas, quelle que soit la teneur en eau

initiale de la gélatine, pour un indice Bloom de 200, la quantité d'agrégats observée a été plus faible pour la condition G (**Figure 2.26hj**) que pour la condition NG (**Figure 2.26be**). La gélatine B125-HG présentait un ensemble très visible d'agrégats ressemblant à un réseau (**Figure 2.26g**), contrairement à la condition D (**Figure 2.26i**) et à la gélatine B200, quelle que soit sa teneur en eau initiale (**Figure 2.26hj**). Les agrégats visibles sur la **Figure 2.26e** (B200-HNG) étaient également présents, à un plus fort grossissement, sans *D*-ribose (**Figure 2.26h**, B200-HG). Avant la glycation, la gélatine B125-HNG (**Figure 2.26d**) avait une structure homogène. La glycation semble donc avoir entraîné une forte modification de l'ultrastructure des gels B125 en condition humide (B125-HG), mais une modification moindre de la gélatine de même indice Bloom en condition sèche (B125-SG).

Ces résultats montrent que, dans nos conditions expérimentales et, pour les gélatines B125, le *D*-ribose provoque la formation d'agrégats uniquement dans le cas des gélatines à teneur en eau élevée (3,74 kg_{eau}/kg_{MS}). Ainsi, la teneur en eau et l'indice Bloom ont un impact sur la réaction de glycation. Nous suggérons que le *D*-ribose est responsable de la formation de liaisons intermoléculaires lors de la réaction de glycation dans les gels de gélatine B125, conduisant à la formation d'agrégats, comme précédemment observé sur la gélatine de poisson glyquée avec du lactose (Etxabide et al., 2015). Dans notre étude, les agrégats observés, après glycation, pour la condition B125-H auraient une structure différente de ceux observés avant glycation dans le cas de la gélatine B200 qui étaient potentiellement des faisceaux de triple-hélice.

Dans les conditions testées, les sites réactifs semblent être plus accessibles dans les gels B125-H, car l'encombrement stérique est réduit par rapport aux gels de gélatine B200.

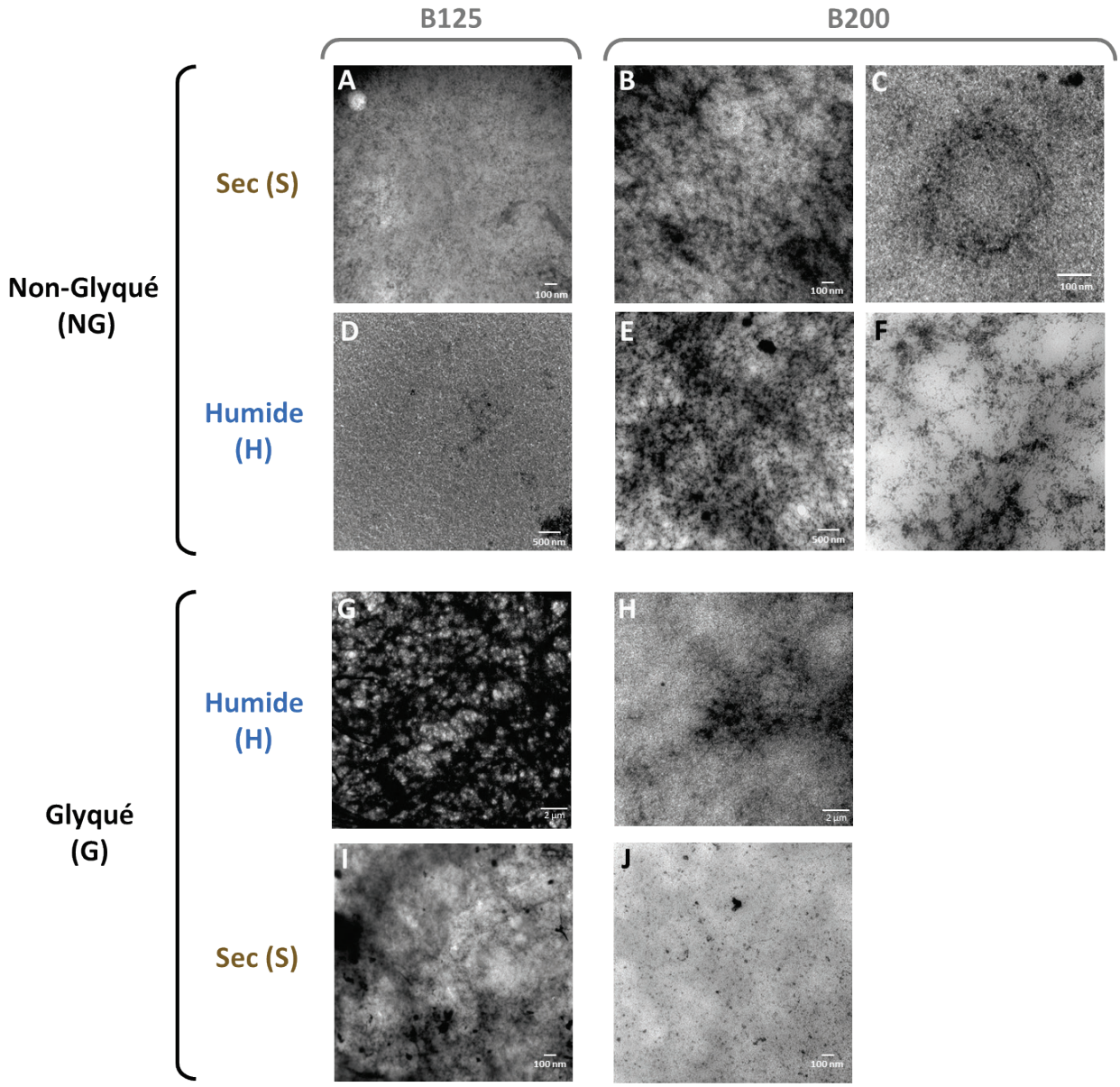


Figure 2.26. *Observations faites en microscopie électronique à transmission (MET) et réalisées sur des gels de gélatine de différents degrés Bloom (B125 vs. B200), de différentes teneurs en eau initiales (Sec – S vs. Humide – H) et en présence ou absence de* D-ribose *(Glyqué – G vs. Non-Glyqué – NG). A: B125-SNG; B: B200-SNG; C: B200-SNG; D: B125-HNG; E: B200-HNG; F: B200-HNG; G: B125-HG; H: B200-HG; I: B125-SG; et J: B200-SG.*

2.3.2.4. Analyse de la structure chimique par spectroscopie FT-IR

2.3.2.4.1. Identification des bandes spectrales d'intérêt

L'objectif est d'identifier des changements au niveau de la structure chimique des gels de gélatine en fonction de 3 paramètres : l'indice Bloom, la teneur en eau initiale de la poudre de gélatine et l'ajout de *D*-ribose (réaction de glycation). Pour cela, six bandes spectrales d'intérêt ont été

identifiées dans la littérature. Le **Tableau 2.14** donne les nombres d'onde correspondants en fonction de la matrice utilisée. A noter des différences sensibles quant à la précision de l'identification des bandes entre les différentes études.

Tableau 2.14. *Nombre d'ondes correspondants aux bandes spectrales d'intérêt (cm^{-1}) relevés dans la littérature sur des matrices carnées.*

Amide I	Amide II	Amide III	Amide A	Amide B	Glucides	Matrice	Références
1650	1580-1510	1400-1200	3300	/	1000-700	Protéines	Bertrand & Dufour (2006)
1635	1529	1241	/	/	/	Gélatine	Bhat & Karim (2014)
1720-1610	1550	1340-1220	2960-2850	/	1150-950	Collagène	Bridelli et al. (2017)
1695-1592	/	/	/	/	/	Gélatine	Polyak & Reich (2019)
1630	1530	1235	/	/	1150-900	Gélatine	Etxabide et al. (2019)
1642-1632	1550-1530	1240-1234	3280-3320	2944-2926	/	Gélatine	Fawale et al. (2022)

Sur la base de l'analyse du **Tableau 2.14**, nous considérons les bandes d'intérêt suivantes : glucides : 1200-900 cm^{-1} ; Amide I : 1750-1600 cm^{-1} ; Amide II : 1599-1500 cm^{-1} ; Amide III : 1340-1220 cm^{-1} ; Amide A : 3320-3280 cm^{-1} ; et Amide B : 2944-2926 cm^{-1}. Les maximums d'absorbance de ces bandes, déterminés expérimentalement, sont indiqués sur la **Figure 2.27**. Lors de mesures dans le moyen infrarouge, les pics de l'eau sont à prendre en compte à cause de leurs interactions potentielles avec l'absorbance des protéines. D'après Bertrand & Dufour (2006), l'eau présente 3 vibrations caractéristiques à 3756, 3657 et 1595 cm^{-1}. Cette dernière vibration se trouve dans la bande Amide II et correspond à une déformation par cisaillement de la molécule d'eau. Or, aucune différence significative d'absorbance n'a été observée à ce nombre d'onde entre les gélatines B125 et B200, ni entre les conditions Glyquées (G) et Non-Glyquées (NG), ce qui tendrait à indiquer qu'une déformation par cisaillement des molécules d'eau présentes dans les échantillons n'interfère pas dans les résultats. Par contre, l'absorbance correspondant à la condition humide (H) est significativement différente de celle correspondant à la condition sèche (S) à 1595 cm^{-1}, ce qui pourrait être dû à la différence de teneur en eau initiale entre les deux conditions H et S.

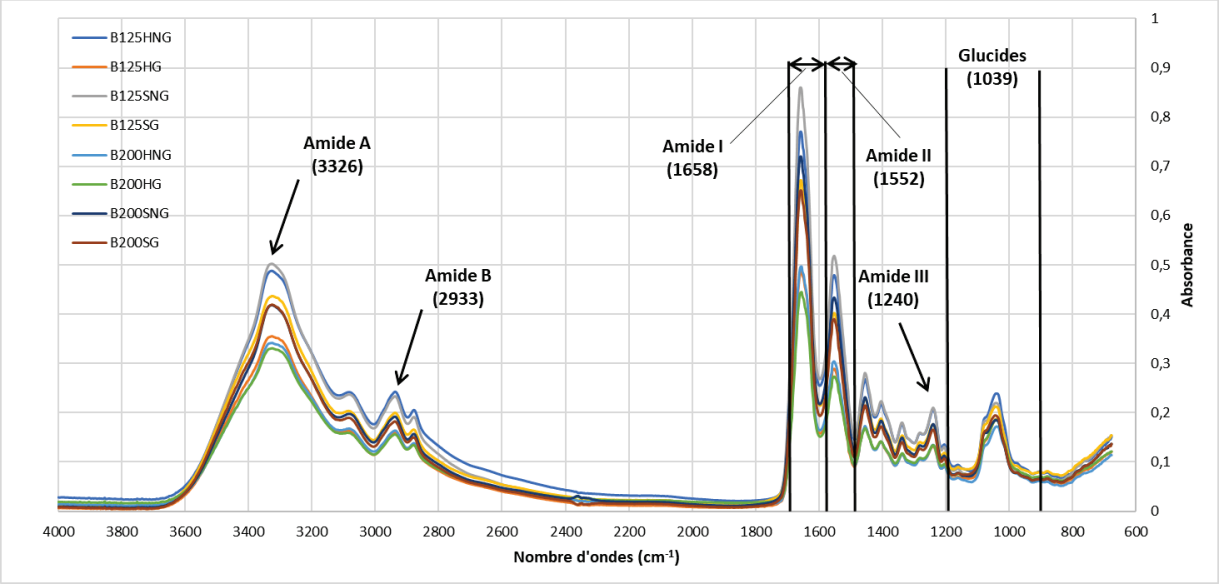


Figure 2.27. *Spectres moyens correspondant aux 8 conditions expérimentales de préparation des gels de gélatine (2 indices Bloom des gélatines x 2 teneurs en eau initiales x présence ou absence de D-ribose). Les bandes spectrales d'intérêt identifiées par rapport aux données de la littérature sont indiquées, ainsi que les valeurs maximales d'absorbance (Prétraitement = EMSC, incluant une normalisation des spectres).*

Le **Tableau 2.15** donne une indication quant aux modifications d'absorbance significatives mesurées entre les conditions expérimentales (B125 *vs.* B200 ; S *vs.* H et G *vs.* NG). Il apparaît que la majorité de ces variations concernent les bandes attribuées aux glucides et aux amides I, II et III. Comme indiqué dans le **Tableau 2.15**, ces variations sont principalement dues à la teneur en eau initiale de la gélatine, puis à la présence de *D*-ribose et, enfin, à l'indice Bloom, pour lequel seulement deux modifications sont observées au niveau de la bande des amides III. Ces différences observées entre les deux indices Bloom, y compris au niveau de la bandes des glucides, peuvent s'expliquer par le procédé d'extraction des gélatines : présence de glucides résiduels, chauffage et réaction de glycation potentielle avec ces glucides ou avec des lipides oxydés présents dans les matières premières (Portier, 2016). La longueur des chaînes protéiques, dépendante de l'indice Bloom, peut alors faire varier la quantité de sites susceptibles de réagir lors de la glycation. Ces premiers résultats montrent que la teneur en eau semble jouer un rôle déterminant dans la structure chimique des échantillons.

Tableau 2.15. *Nombre de variations d'absorbance significativement différentes entre les 8 conditions expérimentales (décrites dans la **Figure 2.13**). Les valeurs correspondent aux absorbances moyennes calculées, significativement différentes (test de Student) entre les indices de Bloom (B125 vs. B200), entre les teneurs en eau (S vs. H) et entre l'ajout ou non de D-ribose (G vs. NG).*

	Bande spectrale (cm^{-1})	B125 *vs.* B200	S *vs.* H	G *vs.* NG
Glucides	1200-900	8	76	62
Amide I	1750-1600	0	18	21
Amide II	1599-1485	0	15	3
Amide III	1340-1220	2	24	12
Amide A	3320-3280	0	2	0
Amide B	2944-2926	0	3	0
Spectre entier	3999-676	47	232	191

Selon Bertrand & Dufour (2006), les bandes Amides A et B sont peu sensibles à la structure secondaire des protéines. Cependant, la vibration d'élongation de la liaison peptidique (N-H) se situe, entre ces 2 bandes, à 3250 cm^{-1}. Seul l'ajout de *D*-ribose provoque une variation significative de l'absorbance (**Figure 2.28**). Ce changement peut être le signe de la liaison du *D*-ribose aux fonctions amines des acides aminés et pourrait ainsi constituer un marqueur de la réaction de glycation.

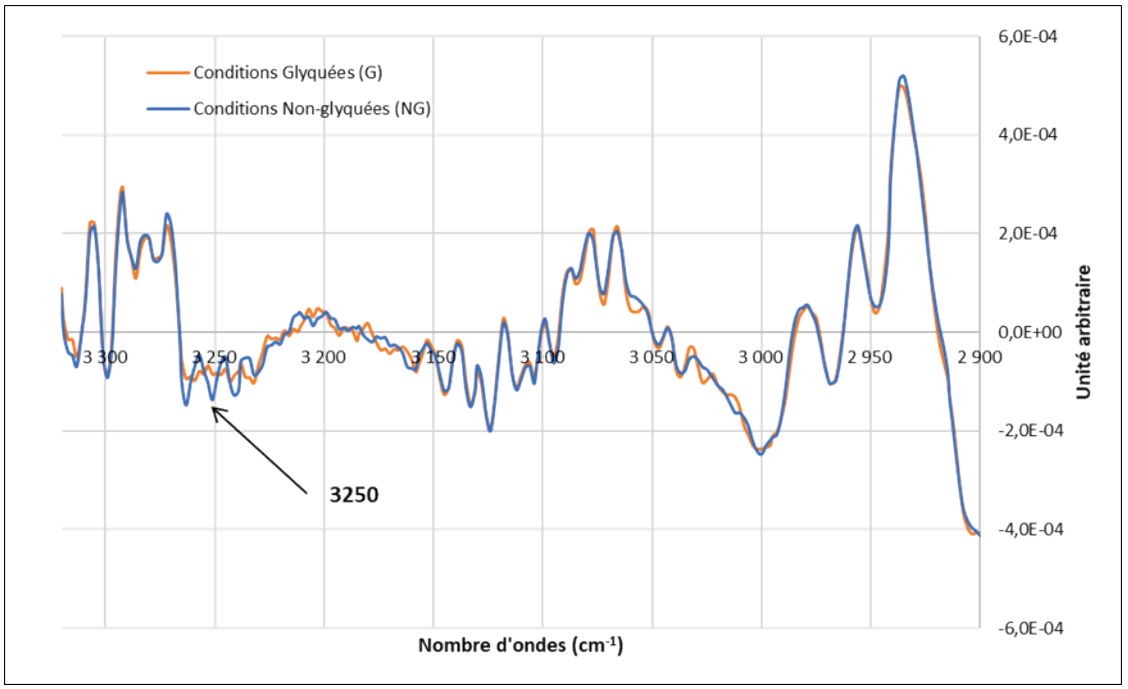


Figure 2.28. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir des 12 conditions Glyquées (G) et des 12 conditions Non-Glyquées (NG) au niveau de la bande spectrale intermédiaire, située entre les bandes Amide A et B. Le nombre d'onde 3250 cm^{-1} est attribué à la vibration d'élongation de la liaison peptidique (traitement : dérivée seconde des spectres).*

2.3.2.4.2. Effets des conditions expérimentales sur la bande d'absorbance attribuée aux glucides

La bande associée aux glucides se situe entre 1150 et 900 cm^{-1} et, est associée à des vibrations d'étirement C-O et C-C et à des vibrations de flexion C-O-H, C-C-O. A environ 1150 cm^{-1}, une vibration caractéristique d'un cycle pyranose est présente (Etxabide, Akbarinejad, et al., 2022). Dans nos travaux, un ensemble de variations d'absorbance significatives a été observé autour de ce nombre d'onde (1153-1145 cm^{-1}), avec un décalage des pics vers 1145 cm^{-1} (**Tableau 2.16**). Les conditions dépendantes de l'indice Bloom et de la teneur en eau ne présentent pas de valeurs significativement différentes dans cette plage de nombre d'onde. Cette bande pourrait donc constituer un marqueur de la réaction de glycation qui, à notre connaissance, n'a jamais été mis en évidence dans la littérature.

Des structures cycliques, qui pourraient être attribuées à la présence de cycles pyranoses, présentent également des vibrations caractéristiques entre 1558 et 1554 cm^{-1} (Movasaghi, Rehman & Rehman, 2007). Nous avons également observé des différences d'absorbance significatives entre les conditions G et NG à ces nombres d'onde.

Tableau 2.16. *Variations d'absorbance, attribuées à la vibration d'un cycle pyranose, entre les conditions correspondant à l'ensemble des gels glyqués (G) et non-glyqués (NG) (unités arbitraires). Comparaison des absorbances après calcul de la dérivée seconde par nombre d'onde (test de Student, P < 0,05).*

Conditions	1153 cm^{-1}	1151 cm^{-1}	1149 cm^{-1}	1147 cm^{-1}	1145 cm^{-1}
G	-5,45E-05[a]	-1,06E-04[a]	-8,97E-05[a]	-7,81E-05[a]	-4,24E-05[a]
NG	-8,80E-05[b]	-1,72E-04[b]	-1,75E-04[b]	-1,53E-04[b]	-8,35E-05[b]

L'ajout de *D*-ribose dans les gels de gélatine semble donc visible à 1150 cm^{-1} du fait de la vibration du cycle pyranose, mais également sur l'ensemble de la bande attribuée aux glucides. Une séparation des échantillons a lieu, selon quatre groupes, en fonction de la présence de *D*-ribose (G *vs*. NG) et de la valeur de la teneur en eau initiale (H *vs*. S) (**Figure 2.29**, exemple des conditions G *vs*. NG). L'indice Bloom, quant à lui, ne permet pas de différencier les groupes d'échantillons dans cette bande spectrale. Un pic d'absorbance maximum est présent à 1039 cm^{-1} (**Figure 2.29**), il est attribué à l'étirement de la liaison C=0 du ribose (Movasaghi et al., 2007).

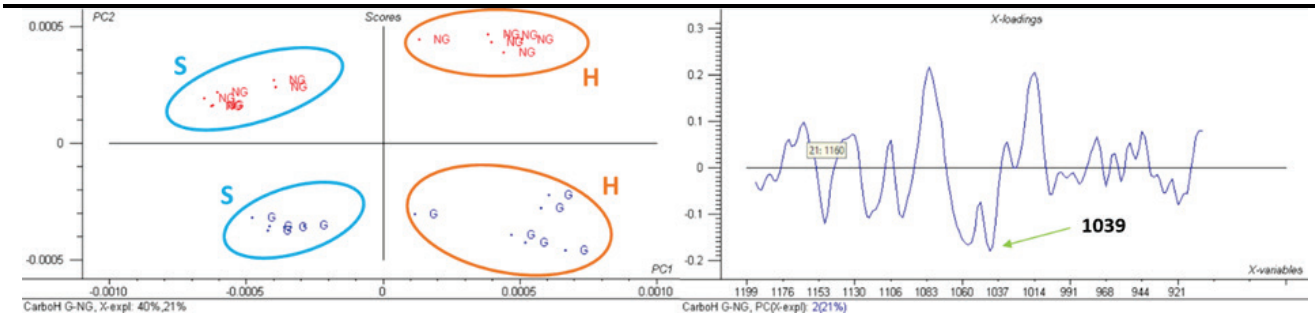


Figure 2.29. *Analyse en composante principale. Effet de l'ajout de D-ribose (G vs. NG) et de la teneur en eau initiale (H vs. S), dans des gels de gélatine, sur les absorbances (après dérivée seconde) mesurées au niveau de la bande spectrale attribuée aux glucides (ACP réalisée avec « The Unscrambler »).*

Les glucides des conjugués protéines-glucides peuvent absorber entre 1200 et 900 cm^{-1} (**Figure 2.30**). Selon Bridelli et al. (2017), ces bandes permettent de discriminer le collagène natif du collagène glyqué avec des absorbances plus élevées pour le collagène natif, notamment entre 1081 et 1032 cm^{-1}. Nous obtenons des résultats similaires sur la gélatine, puisque la moyenne d'absorbance correspondant aux conditions NG est significativement plus élevée ($P < 0,05$) que celle correspondant aux conditions G. Cela indiquerait que la réaction de glycation a bien eu lieu et, confirmerait les résultats obtenus au niveau de la bande 1153-1145 cm^{-1}, ainsi que les résultats obtenus par colorimétrie et MET. La bande spectrale comprise entre 1081 et 1032 cm^{-1} correspond principalement aux vibrations d'étirement C=O et C-C, ainsi qu'aux vibrations de flexion C-O-H et C-C-O. Ces vibrations sont dues à l'interaction des groupes carbonyles du *D*-ribose et des groupes amines du collagène (*N*-glycation) et, traduisent la formation de liaisons covalentes entre ces groupements, ainsi que l'accumulation de produits de glycation (Bridelli et al., 2017). Il semblerait donc que ce soit également le cas pour le collagène dénaturé présent dans la gélatine. Ces résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par LC-MS/MS où seules des réactions de *O*-glycation avaient été mises en évidence.

Selon Movasaghi, Rehman & ur Rehman (2008), les vibrations à 1055 et 1056 cm^{-1} correspondent, respectivement, à la liaison C=O d'un oligosaccharide dans un groupe hydroxyle susceptible d'interagir avec un autre composant de la membrane cellulaire (*i.e.* des protéines) et, à l'étirement de la liaison C=O du désoxyribose (le *D*-ribose perd une molécule d'eau lors de sa fixation à l'acide aminé). Nos résultats (**Figure 2.30**) montrent qu'entre 1056 et 1054 cm^{-1}, les absorbances sont significativement différentes entre les conditions G et NG (et sont dépendantes de la teneur en eau initiale), indiquant une possible surreprésentation de ces vibrations en présence de *D*-ribose. Ceci serait, cette fois, concordant avec les résultats obtenus par LC-MS/MS qui montraient que les conjugués se formaient préférentiellement au niveau des Sérine et Thréonine (*cf.* 2.3.2.2.3). Pour ces

2 acides aminés, Sun et al. (2021) ont montré qu'il s'agissait d'une glycation sur les groupes hydroxyles (*O*-glycation).

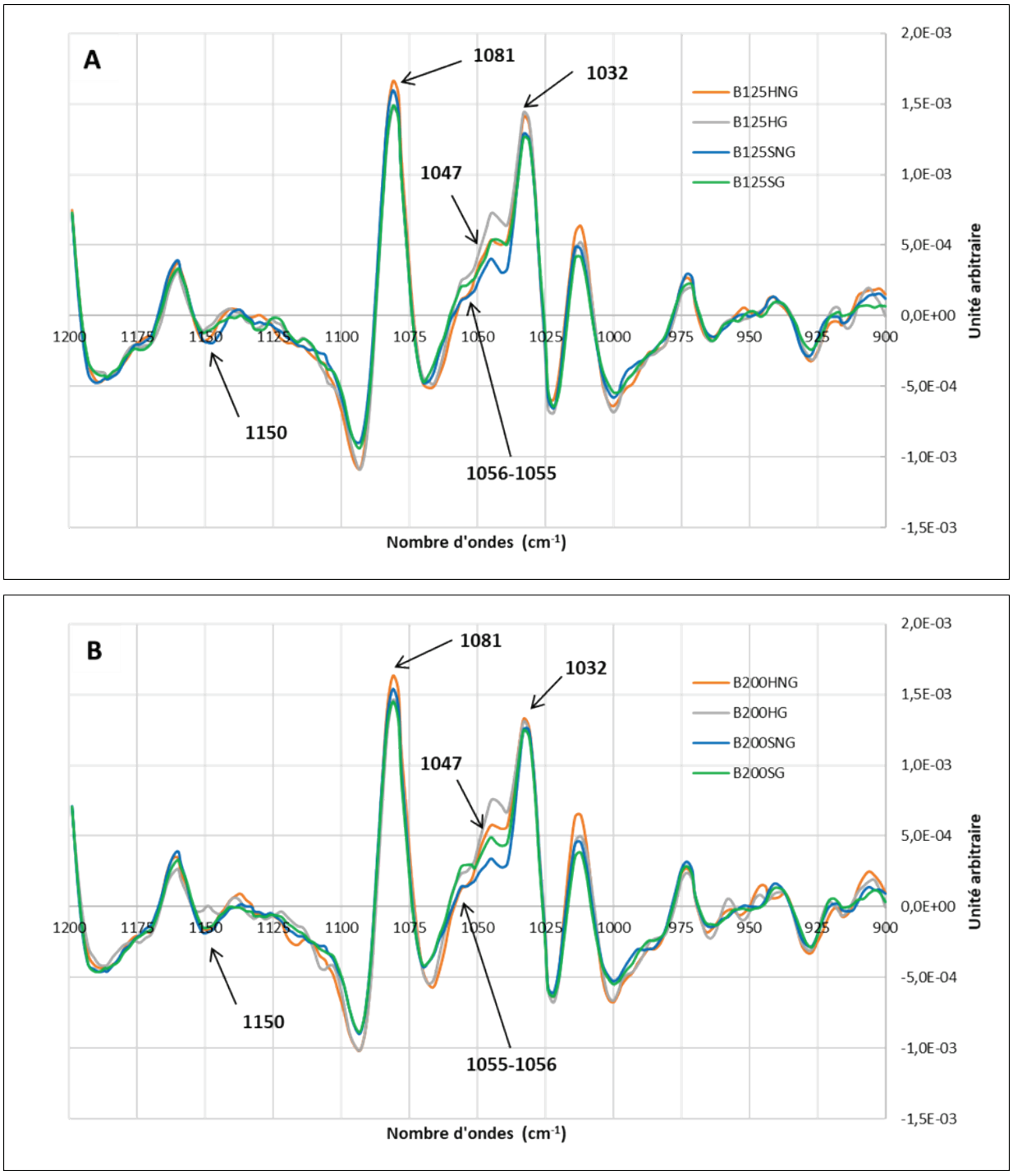


Figure 2.30. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée aux glucides, après dérivée seconde des spectres. (–) condition Humide/Non-Glyquée (HNG) ; (–) condition Humide/Glyquée (HG) ; (–) condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; (–) condition Sèche/Glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200.*

Au vu de ces derniers résultats, il semblerait que les 2 modes de glycation (*O*- et *N*-glycation) ont coexisté lors de nos expérimentations, confirmant ainsi les observations de Sun et al. (2021). Pourtant, lors de l'étude de la formation des conjugués par LC-MS/MS, seule la réaction de *O*-glycation a été mise en évidence. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'hydrolyse enzymatique à la trypsine n'a pas eu une action optimale sur la gélatine glyquée, des expérimentations complémentaires seront donc nécessaires pour le vérifier.

Selon Coopman et al. (2017), l'absorbance à 1047 cm^{-1} caractérise le degré de glycation de la kératine. Nous observons des différences significatives d'absorbance à ce même nombre d'onde entre les conditions G et NG, laissant penser qu'il pourrait également s'agir d'un marqueur pour la glycation de la gélatine. Des différences d'absorbance significatives ont aussi été mesurées, sur les gels de gélatine, à 1047 cm^{-1}, quand les conditions S et NG ont été associées, en opposition aux conditions H et G. Ceci confirmerait le fait que la glycation a lieu en présence de *D*-ribose et qu'elle serait favorisée par une teneur en eau initiale élevée (3,74 kg_{eau}/kg_{MS}). Ces résultats permettent de conforter l'hypothèse de Duconseille, Traikia et al. (2017), selon laquelle la présence d'eau dans la gélatine en poudre permettrait de dérouler les triple-hélices de gélatine. Ceci induirait une meilleure accessibilité du *D*-ribose vis-à-vis des groupements amines et/ou hydroxyles des protéines.

2.3.2.4.3. Effets des conditions expérimentales sur les bandes d'absorbance attribuées aux protéines

La **Figure 2.31** montre l'effet de l'indice Bloom sur les modifications de l'absorbance dans les bandes spectrales attribuées aux amides I, II et III. Il apparaît que les gélatines ne sont pas différenciables en fonction de cet indice au niveau des bandes attribuées aux protéines, même si des tendances apparaissent au niveau des Amides I et II (**Figure 2.31ab**).

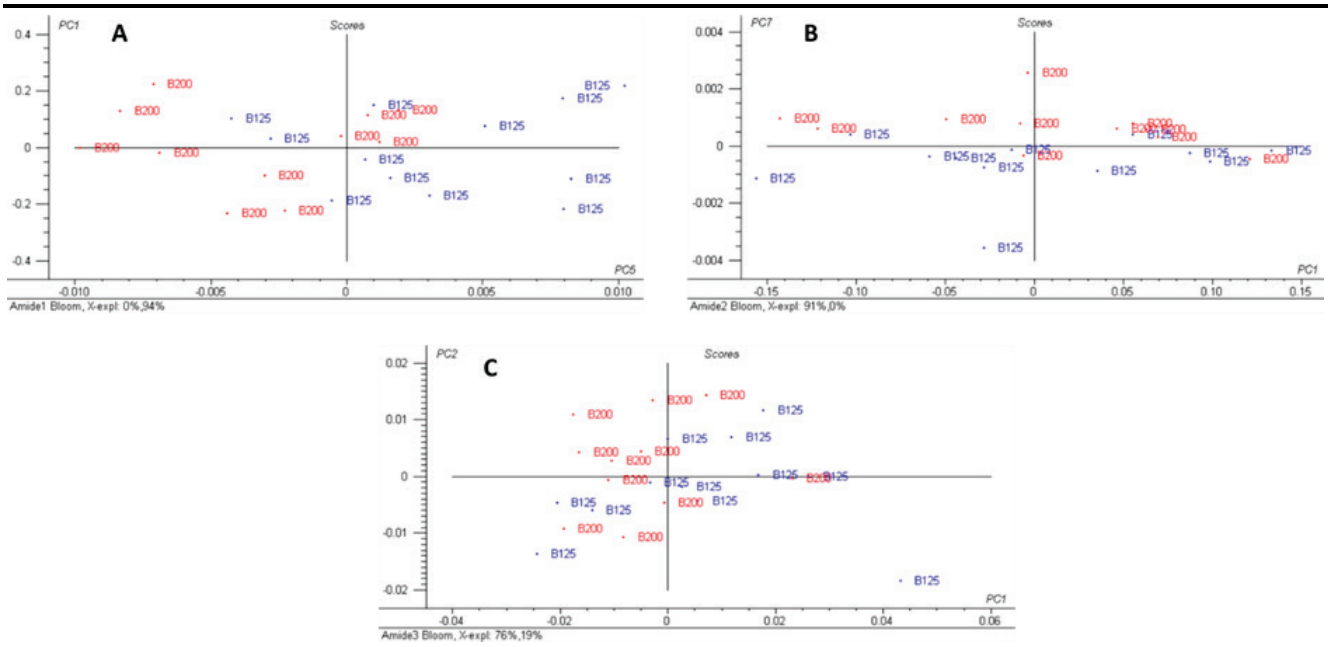


Figure 2.31. *Analyses en composante principale (les composantes principales présentant les meilleures séparations sont représentées). Effet de l'indice Bloom (125 en bleu, 200 en rouge) des gélatines sur les absorbances mesurées dans les bandes spectrales attribuées aux fonctions Amides I, II et III ainsi qu'aux glucides. A – Bande Amide I (1750-1600 cm^{-1}) ; B – Bande Amide II (1599-1500 cm^{-1}) ; C – Bande Amide III (1340-1220 cm^{-1}).*

Le mode de vibration de la bande amide I est essentiellement attribuable à une élongation du groupement C=O, à 1652-1650 cm^{-1} (Bertrand & Dufour, 2006 ; Movasaghi et al., 2008). Sur la base des travaux de Yang et al. (2022), la formation de liaisons covalentes, pour les conditions opératoires décrites, semble se confirmer. En effet, les différences significatives d'absorbance autour de 1652-1650 cm^{-1}, entre les conditions G et NG (**Figure 2.32ab**), peuvent indiquer que la vibration d'étirement C=O varie, ce qui conduit au changement de la bande Amide I. D'après ces auteurs, ces résultats révèlent que le glucide introduit dans la matrice pour initier la réaction de glycation a entraîné un changement d'intensité du pic d'absorbance et, que des conjugués ont été formés par la liaison covalente entre cet ose et la protéine Yang et al. (2022).

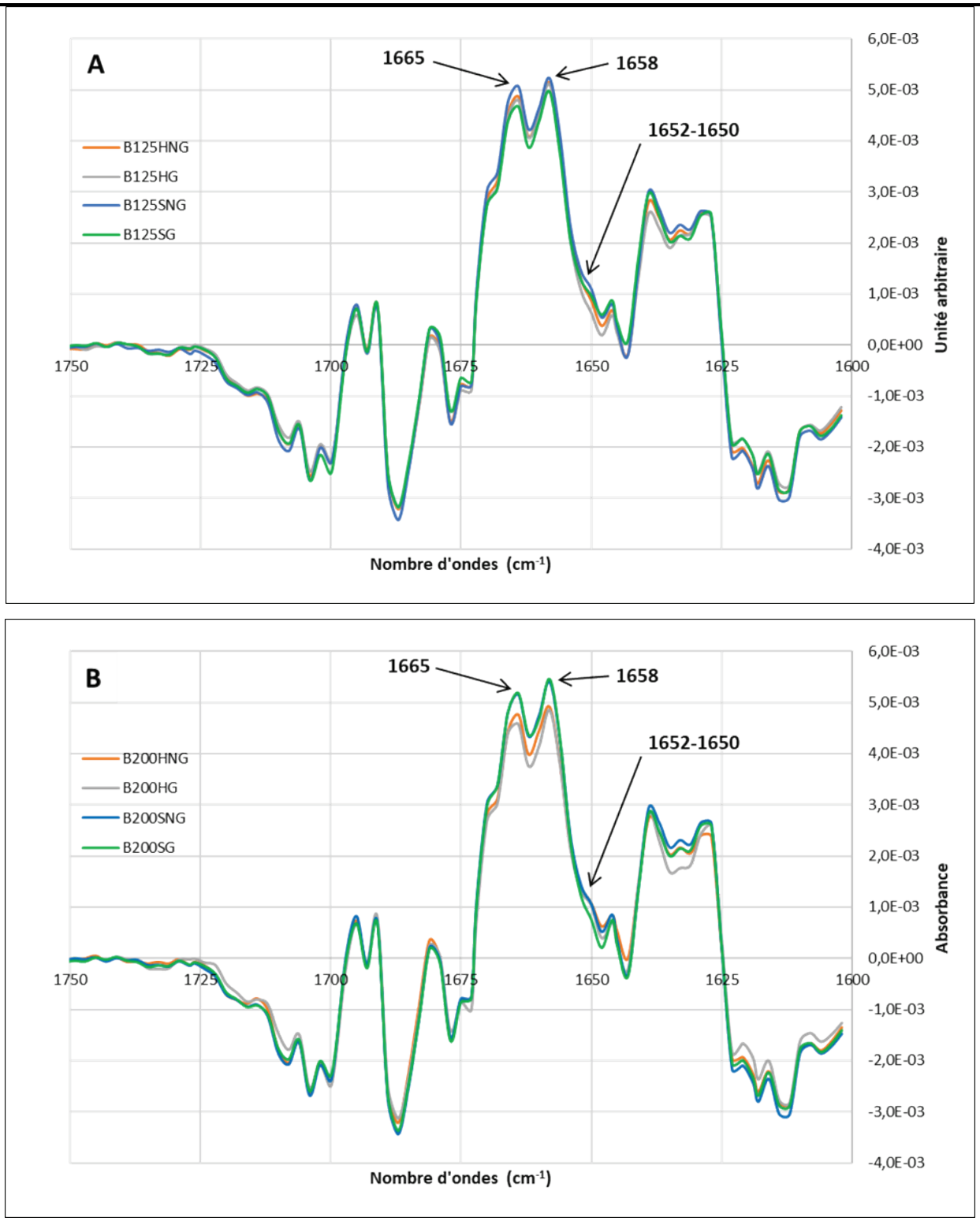


Figure 2.32. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide I, après dérivée seconde des spectres. (–) condition Humide/Non-Glyquée (HNG) ; (–) condition Humide/Glyquée (HG) ; (–) condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; (–) condition Sèche/Glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200. Les nombres d'onde indiqués sont associés à des vibrations de la bande Amide I (étirement de la liaison C=O) (Movasaghi et al., 2008).*

Le déplacement des pics correspondant aux amides I et II vers des nombres d'onde plus faibles ainsi que la baisse de leurs intensités sont également associés à une augmentation des interactions intermoléculaires de type hydrogène dans le collagène (Muyonga, Cole & Duodu, 2004). Dans nos travaux, ce phénomène est observé à 1652 cm^{-1} entre les conditions G et NG. Alors que le pic de l'amide I est présent à 1658 cm^{-1} pour les conditions témoins (NG), un décalage à 1656 cm^{-1} est systématiquement observé en présence de *D*-ribose pour la gélatine B125. Pour la gélatine B200, aucun décalage n'est observé en condition sèche (S), mais en condition humide (H), ce décalage est présent en absence de *D*-ribose (NG) et s'intensifie en sa présence (G) (1654 cm^{-1}) ; les intensités des pics décalés sont systématiquement plus faibles (valeurs d'absorbances non dérivées) (**Tableau 2.17**). A noter que, lors de leurs travaux, Muyonga et al. (2004) observent des décalages du même ordre de grandeur sur de la gélatine.

Tableau 2.17. *Les maximums des pics de la bande spectrale attribuée à l'Amide I, pour chaque indice Bloom (125 et 200) sont indiqués en fonctions des conditions opératoires : Humide/Non-Glyquée (HNG) ; condition Humide/Glyquée (HG) ; condition Sèche/Non-Glyquée (SNG) ; condition Sèche/Glyquée (SG). Chaque valeur est une moyenne calculée à partir de 30 spectres.*

Conditions	Maximum des pics de la bande Amide I (cm^{-1})
B125-HNG	1658
B125-HG	1656
B125-SNG	1658
B125-SG	1656
B200-HNG	1656
B200-HG	1654
B200-SNG	1658
B200-SG	1658

La vibration des fonctions carbonyles (C=O) dans l'hélice-α est comprise entre 1658-1650 cm^{-1} (**Figure 2.32**) pour la bande Amide I et, entre 1548 et 1545 cm^{-1} pour la bande Amide II (**Figure 2.33**) (Deng, 2018). Aucune différence significative n'apparaît entre nos différentes conditions pour ces nombres d'onde, ce qui voudrait dire qu'aucune modification de la structure secondaire, au niveau des hélices-α, n'a eu lieu, quelle que soit la teneur en eau initiale ou suite à l'ajout de *D*-ribose. Toutefois, ce point mérite une attention particulière puisque la présence de ce type d'hélices est contestée dans la gélatine. En effet, d'après Stevenson et al. (2020), leur présence est attestée et, la réaction de glycation en provoquerait même une conversion vers des feuillets-β. En revanche, Pulidori et al. (2023) et Qiao et al. (2023) étudient la structure secondaire de la gélatine, en parlant de doubles ou de triple-hélices, ou de doubles et triple-chaines-α, et non d'hélices-α, à l'instar de (Duconseille,

Traikia et al., 2017). Les résultats présentés ici ne permettent pas de conclure quant à la présence ou non de ce type d'hélice, mais ce qu'il est possible de dire est que, si elles sont effectivement présentes, elles ne subissent pas de modification lors de la glycation, comme l'ont montré (Stevenson et al., 2020).

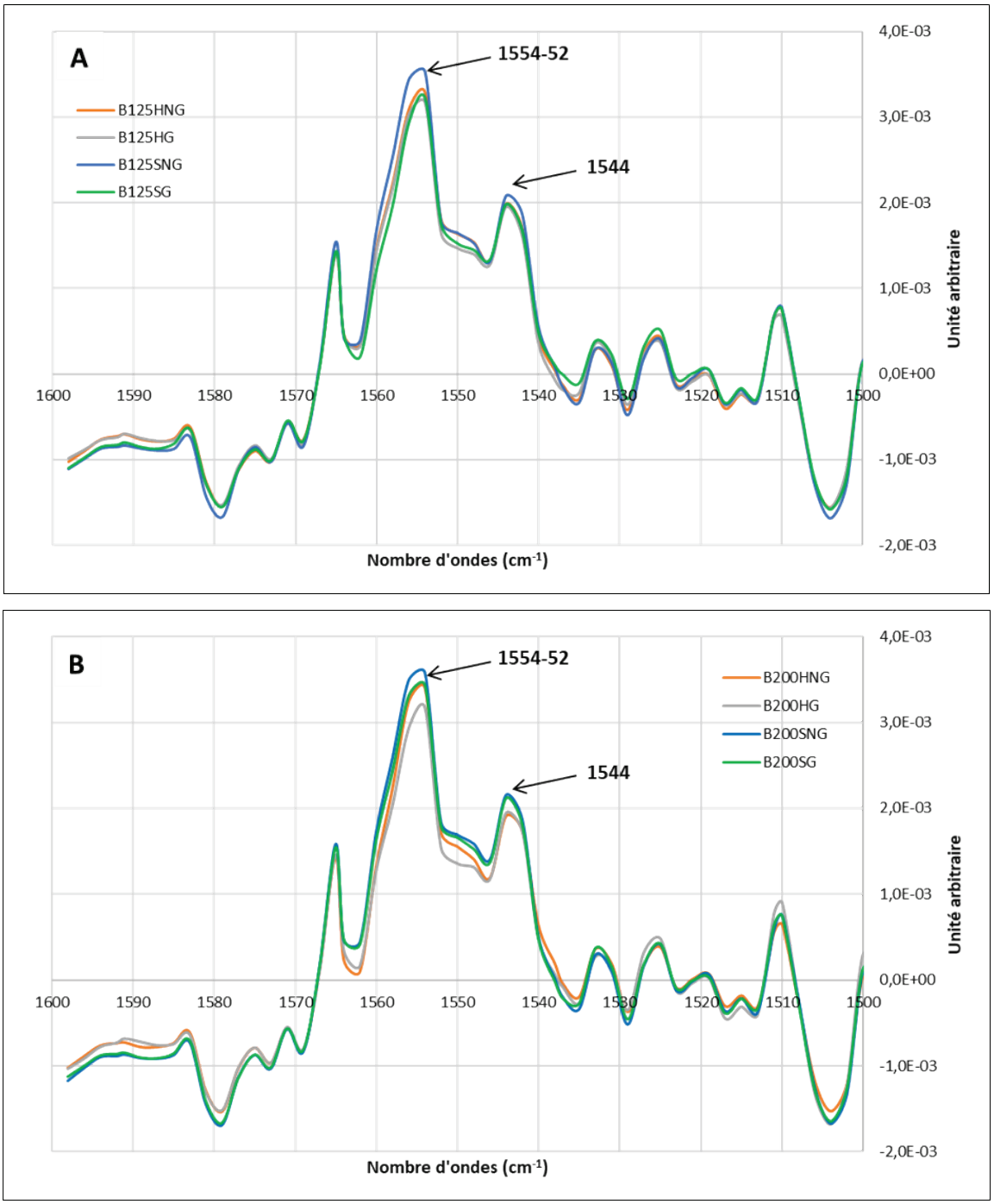


Figure 2.33. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide II, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200.*

La bande amide II se caractérise principalement par un balancement dans le plan du groupe N-H et une élongation du groupement C-N (Bertrand & Dufour, 2006). Un indice Bloom élevé se caractérisant par des longueurs de chaînes polypeptidiques plus importantes (Guo et al., 2003), une surreprésentation de ces groupements dans la gélatine B200 est probable. Une séparation en fonction des indices Bloom apparaît sur les **Figure 2.34a** et **Figure 2.34b** pour les conditions S et H. Ceci pourrait refléter une différence dans les interactions entre les glucides et les protéines, à la fois, à cause de l'encombrement stérique lié à un indice Bloom de 200, mais aussi d'une modification de la structure secondaire due à la teneur en eau. La gélatine B200, possédant des chaînes polypeptidiques plus longues, donc potentiellement avec un nombre de triple-hélices plus important (Guo et al., 2003), pourrait être moins sensible aux interactions avec des glucides résiduels présents dans la gélatine en raison d'un encombrement stérique plus important.

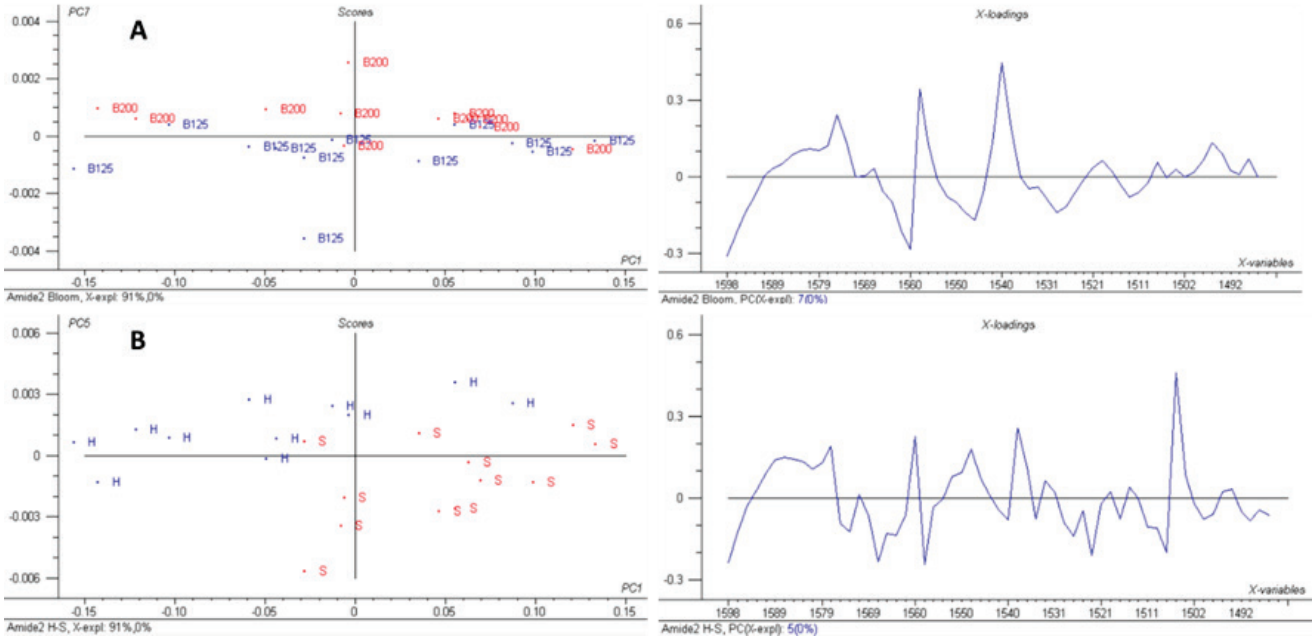


Figure 2.34. *Analyses en composante principale. Absorbances mesurées (dérivée seconde) sur la bande spectrale attribuée à la fonction Amide II (1599-1500 cm^{-1}). A – Effet de l'indice Bloom (B125 en bleu* vs. *B200 en rouge) ; B – Effet de la teneur en eau initiale (H* vs. *S).*

Selon Movasaghi et al. (2008), les nombres d'onde 1284 et 1240 cm^{-1} sont caractéristiques du collagène et, plus précisément du collagène de type I qui absorbe entre 1242 et 1244 cm^{-1}. Pour rappel et, comme présenté dans la section 2.3.2.2.3, la gélatine utilisée dans cette étude est majoritairement composée de collagène de type I. Après le calcul de la dérivée seconde, des variations significatives d'absorbance sont observées à 1284 cm^{-1} entre les conditions H et S et, entre 1240 et 1243 cm^{-1} pour

les conditions G et NG. Ces données montrent que la teneur en eau initiale de la gélatine et l'ajout de *D*-ribose, donc la réaction de glycation, induisent des modifications de la structure secondaire du collagène et, notamment du collagène de type I (**Figure 2.35**).

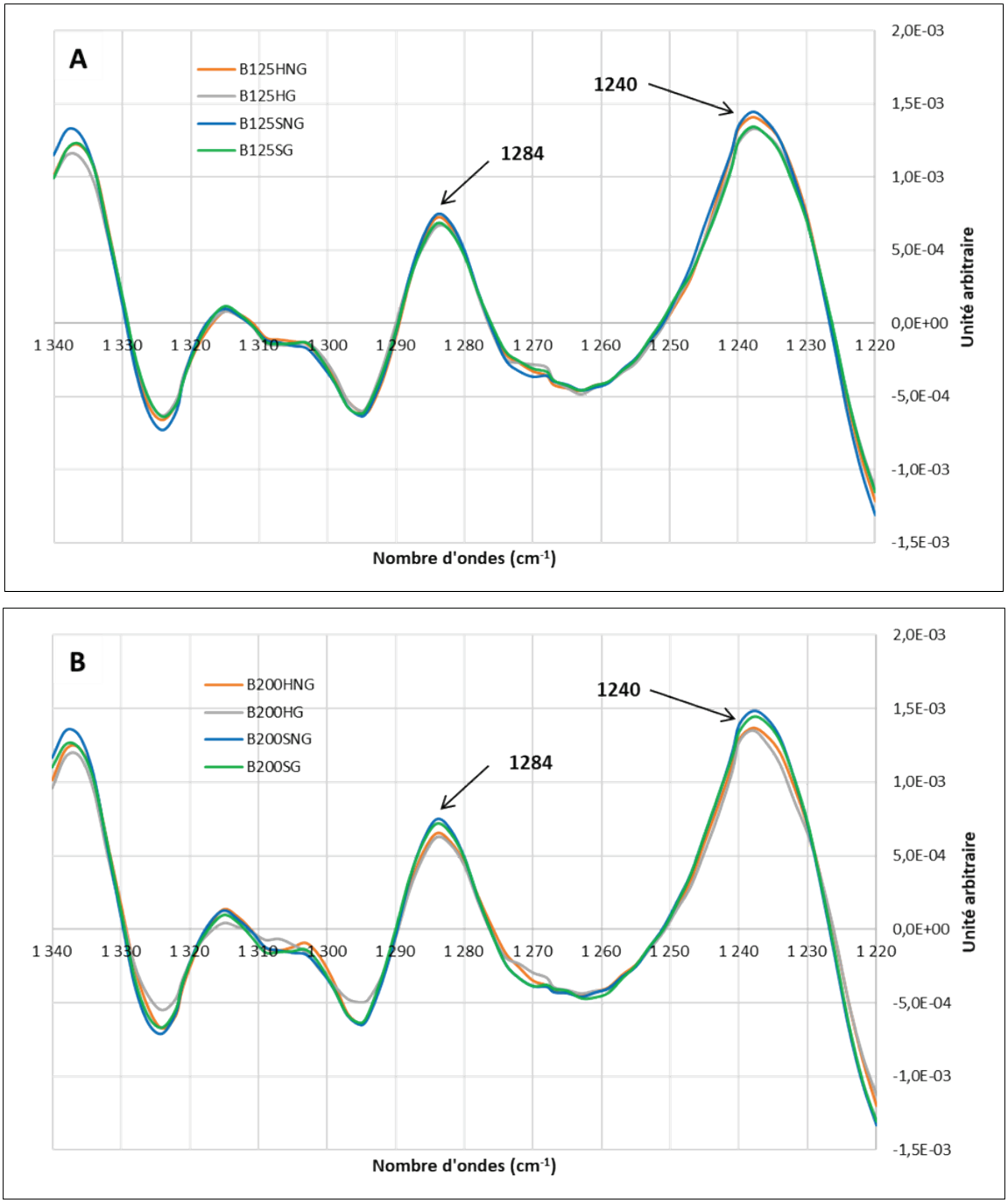


Figure 2.35. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale attribuée à l'Amide III, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200.*

Comme nous l'avons vu précédemment, la littérature scientifique admet majoritairement les réactions de *N*-Glycation, notamment au niveau des Lysines et des Arginines. Selon Bertrand & Dufour (2006), ces 2 acides aminés absorbent de façon significative dans la bande Amide I. L'Arginine est caractérisée par un groupement guanidinium chargé positivement et présente deux vibrations d'élongation localisées à 1773 et 1633 cm^{-1}. Le groupement NH_3^+ de la Lysine est observé vers 1630 et 1525 cm^{-1}. Le premier pic correspond à une vibration de déformation asymétrique et le second est attribué à une déformation symétrique. Lorsque le pH devient supérieur au pK du groupement ε-NH_2 (9,0) de la Lysine, les bandes d'absorption disparaissent et aucune nouvelle bande associée à -NH_2 n'est observée. Le fait d'avoir fixé le pH réactionnel à 9,0 dans nos expériences peut expliquer pourquoi aucune variation significative d'absorbance n'a été observée aux nombres d'onde cités *supra*.

Les liaisons à faible énergie, notamment de type hydrogène responsables de la stabilité de la structure secondaire des protéines, peuvent être mises en évidence à différents nombres d'onde :

- A 1623 cm^{-1} : Ces liaisons peuvent être responsables de l'agrégation des particules dans des gels protéiques (Lefèvre & Subirade, 2000). Les analyses statistiques montrent une différence significative ($P < 0,05$) des absorbances mesurées (après dérivée seconde) entre les conditions H et S, ainsi qu'entre les conditions G et NG, indiquant ainsi une possible modification des liaisons intra- et/ou interchaînes au niveau de la structure secondaire des protéines. L'implication des molécules d'eau dans la formation de liaisons hydrogène au sein d'un réseau de gélatine est aussi démontrée (Rather, Akhter et al., 2022). Il est donc probable qu'une variation de la teneur en eau initiale de la gélatine ait un effet sur la quantité de ce type de liaisons. La molécule de *D*-ribose, une fois ajoutée dans le milieu réactionnel, pourrait, quant à elle, se comporter comme un perturbateur de la formation de liaisons hydrogène.
- Entre 3600 et 3200 cm^{-1} : Les fonctions hydroxyles sont rencontrées dans différentes molécules, notamment dans les molécules d'eau. Elles présentent une forte bande d'absorption dans cet intervalle (bande spectrale attribuée à la fonction Amide A). La présence de liaisons hydrogène, fortement liée à la présence de fonctions hydroxyles, se traduit donc par une large bande d'absorption vers 3300 cm^{-1}. Les fonctions -OH, non impliquées dans des liaisons hydrogène, se caractérisant, quant à elles, par une bande plus étroite vers 3600 cm^{-1} (Bertrand & Dufour, 2006). La **Figure 2.36** présente les spectres moyens après calcul de la dérivée seconde. Des pics sont bien identifiés à 3600 et 3300 cm^{-1}. Cependant et,

contrairement aux absorbances mesurées à 1623 cm^{-1}, aucune différence significative n'est observée entre les conditions expérimentales.

L'effet de la glycation sur les liaisons à faible énergie de type hydrogène reste donc sujette à discussion.

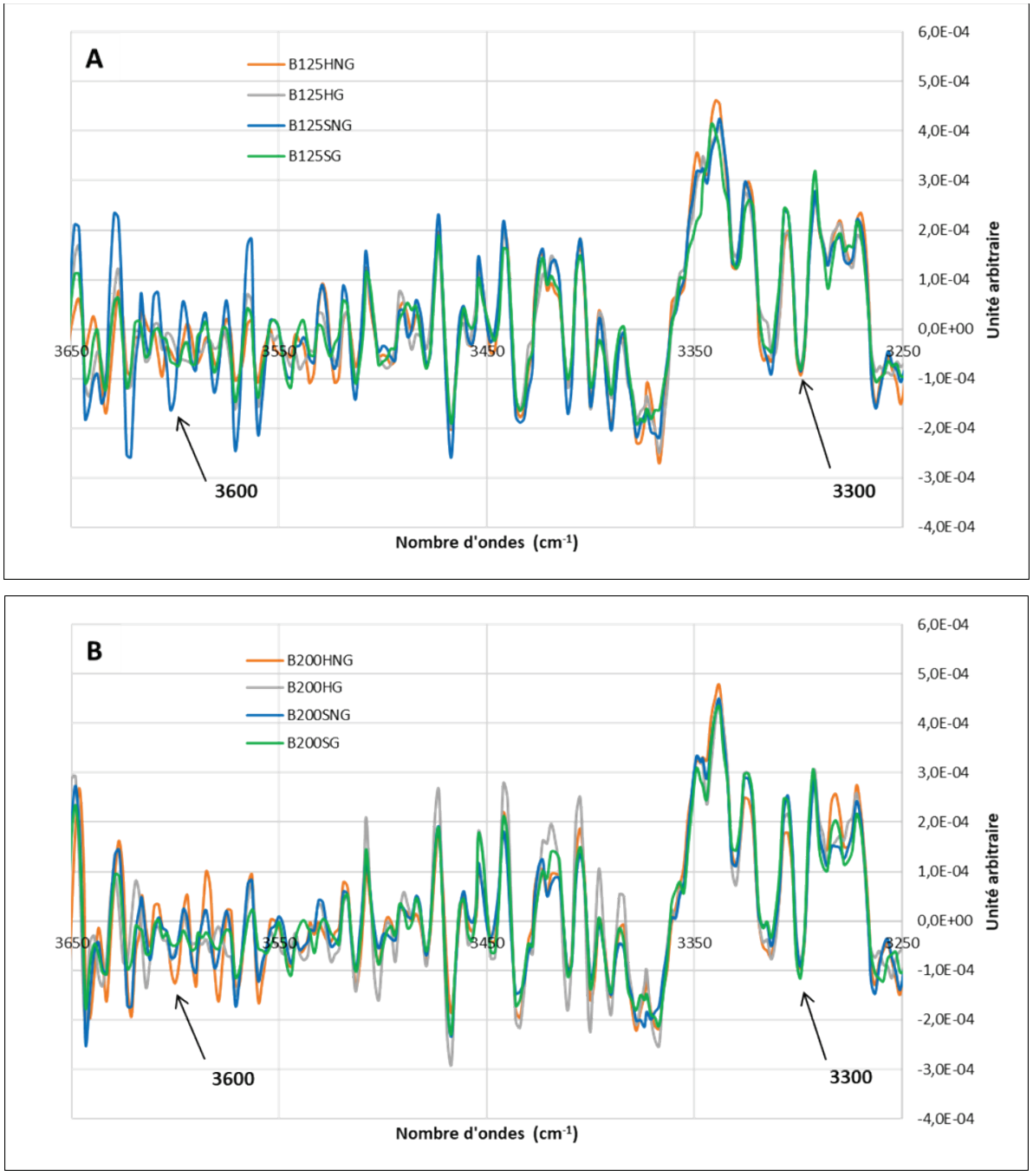


Figure 2.36. *Représentation des courbes moyennes obtenues à partir de 3 répétitions pour la bande spectrale 3600-3200 cm^{-1}, après dérivée seconde des spectres. (–) condition humide/non-glyquée (HNG) ; (–) condition humide/glyquée (HG) ; (–) condition sèche/non-glyquée (SNG) ; (–) condition sèche/glyquée (SG). A – Gélatine d'indice Bloom 125 ; B – Gélatine d'indice Bloom 200.*

Le rapport d'absorbance A amide III (1240 cm^{-1})/A 1450 cm^{-1} est couramment utilisé pour caractériser l'intégrité des structures en triple-hélice dans un gel de gélatine (Mao et al., 2022 ; Peng et al., 2021). Plus la valeur de ce rapport est proche de 1, plus les triple-hélices sont nombreuses. Le **Tableau 2.18** permet de comparer les différentes conditions opératoires selon la quantité de structures en triple-hélice obtenue à partir du calcul de ce rapport. Il apparaît que les facteurs prédominants permettant d'obtenir le plus de ces structures sont l'indice Bloom (B200) et une teneur en eau initiale élevée. Il est à noter que les rapports calculés ici sont relativement éloignés de 1 (de l'ordre de 0,8) et peu discriminants entre les conditions (car compris entre 0,77 et 0,82), soulignant le fait que la proportion des triple-hélices serait limitée.

Déterminé pour la première fois par Gordon, Huang, Lord & Yannas (1974), ce rapport a depuis été utilisé à plusieurs reprises dans la littérature et, même encore très récemment (Sylvester, Yanns, Salzman & Forbes, 1989 ; Guzzi Plepis, Goissis & Das-Gupta, 1996 ; Mao et al., 2022 ; Peng et al., 2021). Initialement, ce rapport a été calculé sur du collagène (concentration non précisée), en se basant sur les absorbances à 345 et 1450 cm^{-1}, puis une corrélation a été établie entre 1235 (puis 1240) et 1450 cm^{-1} au niveau de la bande des Amides III. L'absorbance mesurée à 1450 cm^{-1} a été considérée comme un étalon interne invariant (hors condition de dénaturation thermique du collagène). Les résultats de la présente étude montrent que des variations significatives des absorbances ont été mesurées entre 1454 et 1446 cm^{-1}, notamment en fonction des conditions de teneur en eau et de glycation (S *vs.* H et G *vs.* NG), ce qui indiquerait que considérer l'absorbance à 1450 cm^{-1} comme un étalon serait inadapté. De plus, le lien entre le rapport d'absorbance et la quantité de structures en triple-hélice est basé sur le fait qu'une gélatine chauffée à 60 °C contiendrait 0 % de triple-hélice et que le collagène natif en contiendrait 100 % (Gordon et al., 1974). Le fait qu'une température de 60 °C suffise à dénaturer l'ensemble de ces structures est discutable. En effet, d'après Rather, Majid et al. (2022), la quantité d'acides iminés (molécule possédant à la fois un groupe fonctionnel COOH, carboxyle et un groupe fonctionnel >C=N-, imine) influence la conversion des structures de type bobine aléatoire vers les structures en hélice et, a donc un effet sur la stabilité thermique de la gélatine. Par conséquent, la température de dénaturation peut varier en fonction de l'origine de la gélatine. Ces données sont difficilement généralisables et nous poussent à considérer avec une extrême précaution les interprétations faites à partir de l'analyse du rapport A amide III (1240 cm^{-1})/A 1450 cm^{-1}.

Tableau 2.18. *Rapport Amide III/A 1450 cm^{-1} représentant la quantité de triple-hélices en fonction des conditions expérimentales. Plus le rapport est proche de 1, plus le nombre de triple-hélices est élevé.*

Conditions	A amide III (1240 cm^{-1})	A 1450 cm^{-1}	A amide III/A 1450 cm^{-1}
B200-HG	0,1341	0,1644	**0,82**
B200-HNG	0,1349	0,1681	**0,80**
B200-SG	0,1658	0,2086	**0,79**
B125-HNG	0,2069	0,2609	**0,79**
B125-HG	0,1321	0,1667	**0,79**
B200-SNG	0,1769	0,2255	**0,78**
B125-SG	0,1764	0,2248	**0,78**
B125-SNG	0,2101	0,2735	**0,77**

2.3.2.5. Etude des propriétés texturales

Les résultats de l'analyse des propriétés texturales renseignent sur l'effet de l'indice Bloom (B125 ou B200), de la teneur initiale en eau de la gélatine (S ou H) et de l'ajout ou non de *D*-ribose (G ou NG) sur la texture des gels de gélatine. Le **Tableau 2.19** indique que les valeurs de fermeté, de cohésion et de masticabilité augmentent significativement avec l'indice Bloom, ce qui est conforme à la littérature (Bigi, Panzavolta,& Rubini, 2004 ; Civille & Szczesniak, 1973).

Tableau 2.19. *Valeurs moyennes (n=18) des 5 paramètres de texture de gels de gélatine obtenus par le test TPA en fonction de l'indice Bloom (B125* vs*. B200), de la teneur en eau initiale (Sec, S* vs*. Humide, H), et de la présence ou non de D-ribose (Glyqué, G* vs*. Non-Glyqué, NG). Deux valeurs moyennes (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre de texture, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux.*

	Fermeté (N)	Adhérence (J)	Cohésion	Elasticité	Masticabilité (N)
B125	43,28±2,23^{a}	-0,16±0,01	0,89±0,00^{a}	0,98±0,00	37,99±2,07^{a}
B200	56,11±2,25^{b}	-0,16±0,01	0,91±0,00^{b}	0,98±0,00	49,67±1,89^{b}
S	62,29±1,47^{c}	-0,17±0,01	0,90±0,00^{c}	0,98±0,00	55,08±1,21^{c}
H	37,63±1,20^{d}	-0,15±0,01	0,89±0,00^{d}	0,98±0,00	33,05±1,15^{d}
G	45,84±2,24^{e}	-0,15±0,01	0,91±0,00^{e}	0,98±0,00	40,69±2,04^{e}
NG	53,84±2,54^{f}	-0,17±0,01	0,89±0,00^{f}	0,98±0,00	47,22±2,24^{f}

Nos résultats indiquent des valeurs de fermeté et de masticabilité significativement plus élevées pour les gels B200 par rapport aux gels B125, ce qui dénote une plus grande résistance mécanique à la déformation. Un indice Bloom élevé, une faible teneur en eau initiale et la présence de *D*-ribose ont amélioré la cohésion de l'échantillon. Les gels obtenus à partir de gélatine en condition humide (H) ont

montré une fermeté, une cohésion et une masticabilité significativement plus faibles que les gels obtenus à partir de gélatine préparée en condition sèche (S). L'augmentation de l'apport en eau dans les gels peut avoir influencé la mobilité moléculaire dans la gélatine (Duconseille, Traikia et al., 2017). Nous avons observé que les gels sans ajout de *D*-ribose (NG) présentaient des valeurs de fermeté et de masticabilité significativement plus élevées que les gels avec *D*-ribose (G), ce qui indique que la glycation aurait tendance à diminuer la résistance mécanique des gels. Des résultats similaires ont déjà été rapportés sur des gels de blanc d'œuf glyqués avec du ribose par Yang et al. (2021), qui ont indiqué que l'action réductrice du ribose devait affecter les liaisons disulfures au sein du gel de blanc d'œuf. Bien que cette explication ne s'applique pas entièrement à la gélatine car elle ne contient que peu d'acides aminés soufrés capables de former ce type de liaison (**Tableau 2.2**), les valeurs de cohésion significativement plus élevées pour les gels glyqués montrent qu'ils peuvent néanmoins se déformer davantage avant de se rompre.

Les triple-hélices au sein de la gélatine ont probablement été partiellement dénaturées en raison de la température réactionnelle (50 °C). Les interactions entre le *D*-ribose et les chaînes de protéines maintiendraient les structures dénaturées après refroidissement, ce qui entraînerait une diminution de la fermeté. Ces modifications structurelles pourraient également être attribuées à un nombre réduit de liaisons hydrogène présentes entre les triple-hélices partiellement dénaturées.

Cette étude a également mis en évidence l'hétérogénéité des résultats obtenus en fonction des lots de gélatine utilisés. Les résultats présentés sur la **Figure 2.37** proviennent d'une gélatine d'indice Bloom 200, mais d'un lot différent de celle utilisée précédemment. Les **Figure 2.37a** et **Figure 2.37b** confirment l'effet majeur du pH, au travers du pouvoir tampon, mais elles montrent également que, quand le pH est maintenu à un niveau suffisant, la réaction de glycation peut provoquer un effet de renforcement des propriétés mécaniques des gels. Ces résultats ont été obtenus sur un nombre limité de mesures, d'où l'utilisation d'un test statistique non-paramétrique (test de Wilcoxon-Mann-Whitney). De tels résultats, avec des différences aussi marquées entre des gels glyqués et non-glyqués, n'ont jamais été constatés sur d'autres lots ou types de gélatine : 6 autres lots de gélatines, d'origine variée, ont pourtant été testés (résultats non présentés ici). Ce point explique et justifie la mise en place des expérimentations décrites sur la **Figure 2.13**.

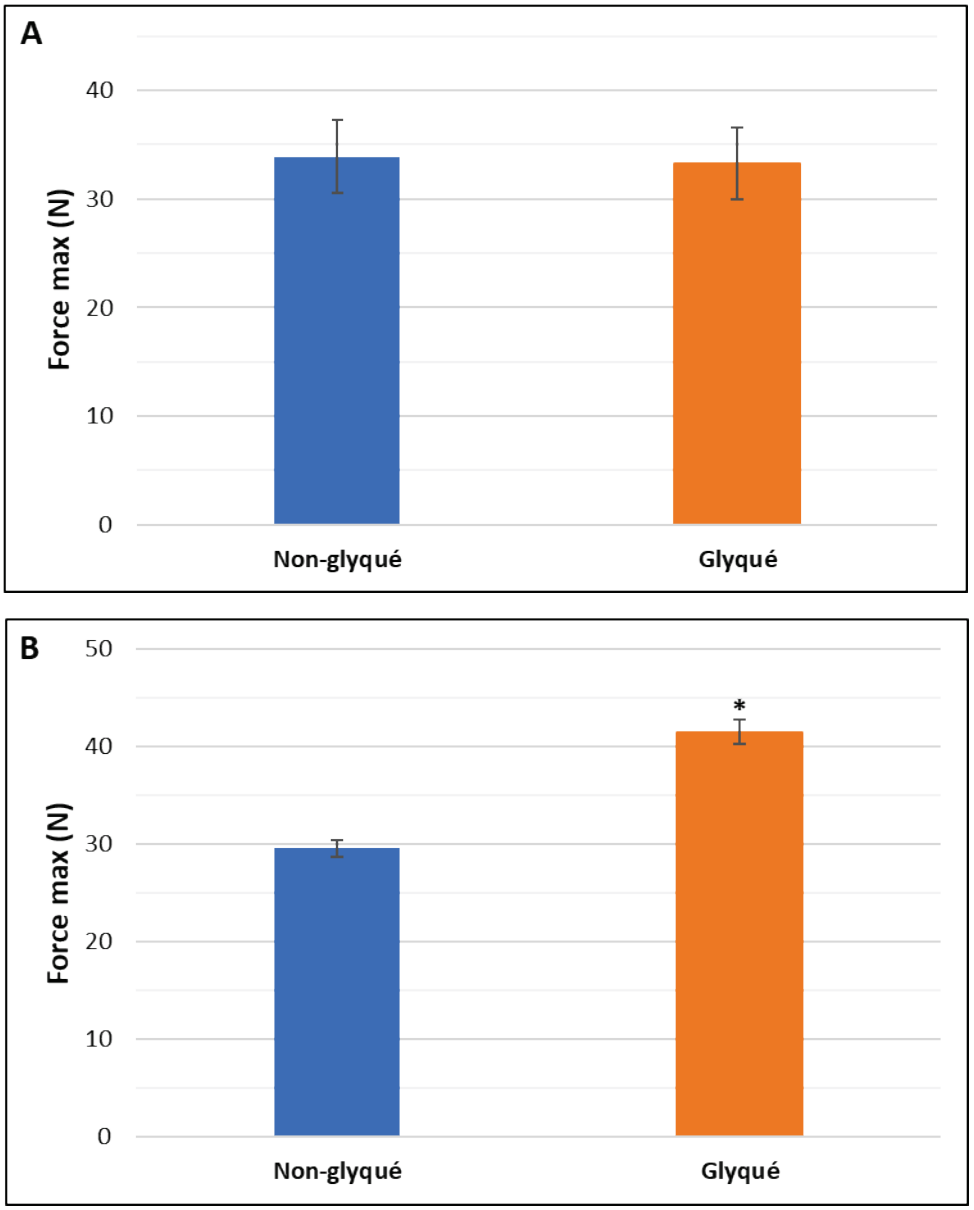


Figure 2.37. *Mesures de la force de gels préparés avec deux lots différents de gélatine en poudre d'indice Bloom 200, issus d'un même fournisseur. A - un tampon pH 9 à 0,1 M ne permet pas de différencier les conditions de glycation ; B – pour un tampon pH 9 à 1 M, une différence significative a été observée entre le témoin non-glyqué (en bleu) et la condition « glyquée » contenant du* D*-ribose (en orange), suite à l'application du test de Wilcoxon-Mann-Whitney (P < 0,05).*

2.3.2.6. Analyse du comportement rhéologique

Les mesures texturales présentées précédemment ont été complétées par des mesures du comportement rhéologique des gels. Pour toutes les conditions étudiées, les valeurs du module de conservation (G') sont systématiquement supérieures aux valeurs du module de perte (G") (**Figure 2.38**), ceci indique que les gels étudiés se comportent comme des solides viscoélastiques.

Les **Tableau 2.20**, **Tableau 2.21** et **Tableau 2.22** comparent les valeurs moyennes des paramètres

rhéologiques τ-croisement, G' max et τ-fin-LVR déterminés à partir des courbes présentées sur la **Figure 2.38**. τ-croisement correspond aux valeurs de contrainte de cisaillement au croisement des modules viscoélastiques G' et G'' ; G'max à la valeur du module de conservation dans le domaine viscoélastique linéaire et, τ-fin-LVR, à la contrainte de cisaillement en fin de région viscoélastique linéaire (**Figure 2.38**).

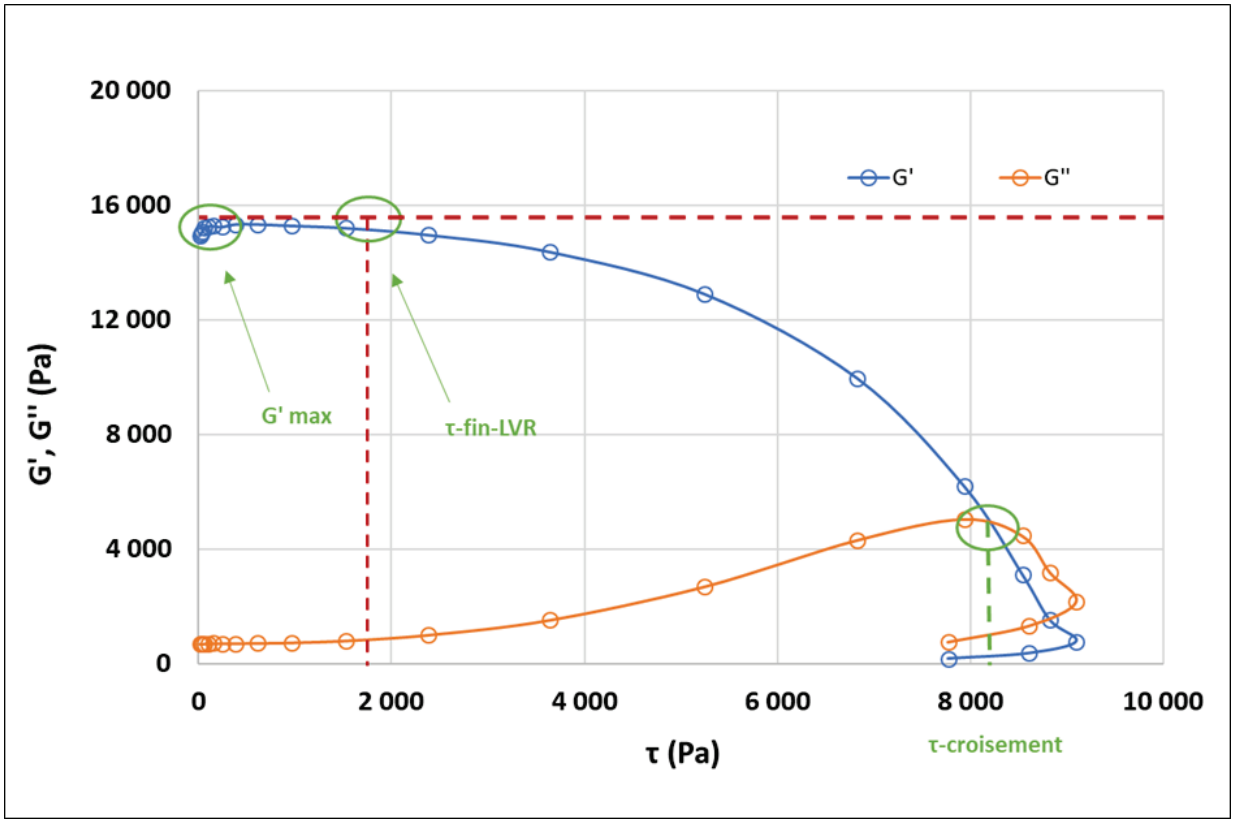


Figure 2.38. *Représentation graphique des courbes des modules de stockage (G') et de module de perte (G''), en fonction de la contrainte de cisaillement, obtenues pour un gel de gélatine préparé à base de gélatine d'indice Bloom 125 en condition Sèche/Glyquée (SG). Les paramètres calculés (τ-croisement, G' max et τ -fin-LVR) sont indiqués en vert.*

Les résultats obtenus montrent que ces paramètres sont significativement plus élevés pour le gel de gélatine B200 par rapport au gel de gélatine B125, ainsi que pour la condition S par rapport à la condition H. Ceci est cohérent avec les travaux de Bigi et al. (2004) qui ont montré une relation linéaire entre l'indice Bloom et la quantité de triple-hélices. Le **Tableau 2.20** montre également que G'max est le seul paramètre qui permet de différencier les différentes conditions testées.

Tableau 2.20. *Effet de l'indice Bloom (B125* vs. *B200), de la teneur en eau initiale (Sec* vs. *Humide) et de l'ajout de* D-*ribose (Glyqué* vs. *Non-Glyqué) sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux.*

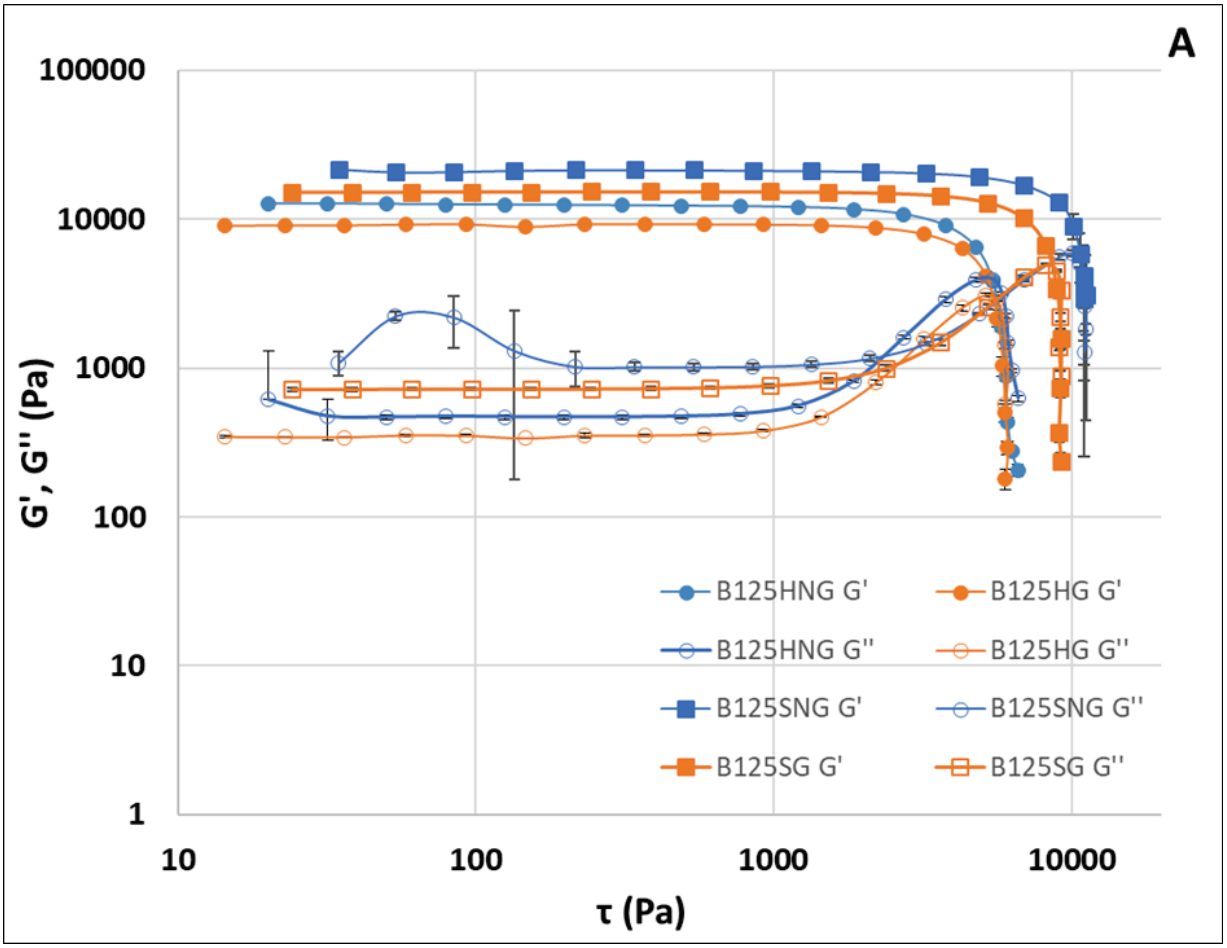
	τ-croisement (Pa)	G' max (Pa)	τ-fin-LVR (Pa)
B125	7110±337[a]	13913±676[a]	3599±197[a]
B200	8781±567[b]	17532±915[b]	4635±331[b]
Sec (S)	10407±359[a]	20023±622[a]	5509±226[a]
Humide (H)	5576±130[b]	11593±294[b]	2777±87[b]
Glyqué (G)	7915±477[a]	14097±740[a]	4159±277[a]
Non-glyqué (NG)	8001±504[a]	17447±886[b]	4088±298[a]

Les mesures de τ-fin-LVR effectuées suggèrent qu'une faible teneur en eau et un indice Bloom élevé (B200-S) confèrent aux gels une meilleure résistance à la déformation/déstructuration. Ce n'est pas le cas pour la condition glyquée (G) (**Tableau 2.20**). Cependant, pour les conditions HG, la valeur de τ-fin-LVR était significativement plus élevée que pour les conditions HNG (**Tableau 2.21**). A noter qu'il s'agit du seul cas dans cette étude où le gel a résisté plus longtemps à la déformation, en condition glyquée. Ceci pourrait être le résultat de la quantité d'eau présente plus importante dans la gélatine. Ceci aurait favorisé la mobilité des chaînes protéiques et le déroulement des triple-hélices (Duconseille, Traikia et al., 2017 ; Levine & Slade, 1988). En conséquence, la réaction de glycation et la formation de liaisons covalentes entre les chaînes de gélatine auraient été favorisées, augmentant ainsi la résistance globale du gel. Dans ce cas particulier (conditions B200-HG), le *D*-ribose pourrait avoir eu un accès facilité aux sites réactifs, rendant donc possible l'établissement de liaisons covalentes.

Tableau 2.21. *Effets de l'ajout de* D-*ribose en fonction de la teneur initiale en eau de la gélatine sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux.*

		τ-croisement (Pa)	G' max (Pa)	τ-fin-LVR (Pa)
Sec (S)	**G**	10093±544[a]	17796±686[a]	5363±341[a]
	NG	10741±468[a]	22380±699[b]	5664±301[a]
Humide (H)	**G**	5738±239[a]	10397±330[a]	2954±145[a]
	NG	5413±100[a]	12788±282[b]	2600±82[b]

L'ajout de *D*-ribose a significativement diminué la valeur du paramètre G'max, quelle que soit la teneur en eau (**Tableau 2.21**). Indépendamment de l'indice Bloom, les gels de gélatine préparés en condition sèche (S) ont résisté à une plus grande déformation que les gels de gélatine préparés en condition humide (H). En effet, pour les trois paramètres mesurés (τ-croisement, G' max et τ -fin-LVR), les valeurs obtenues dans les conditions S étaient presque deux fois plus élevées que celles correspondant aux conditions H. La **Figure 2.39** confirme que la gélatine B125 présente un comportement significativement différent, avec des valeurs d'élasticité (G') et de module visqueux (G'') plus élevées et, une Région Viscoélastique Linéaire (LVR) plus courte pour la condition S en fonction de la contrainte appliquée, à la fois en présence et en absence de *D*-ribose.



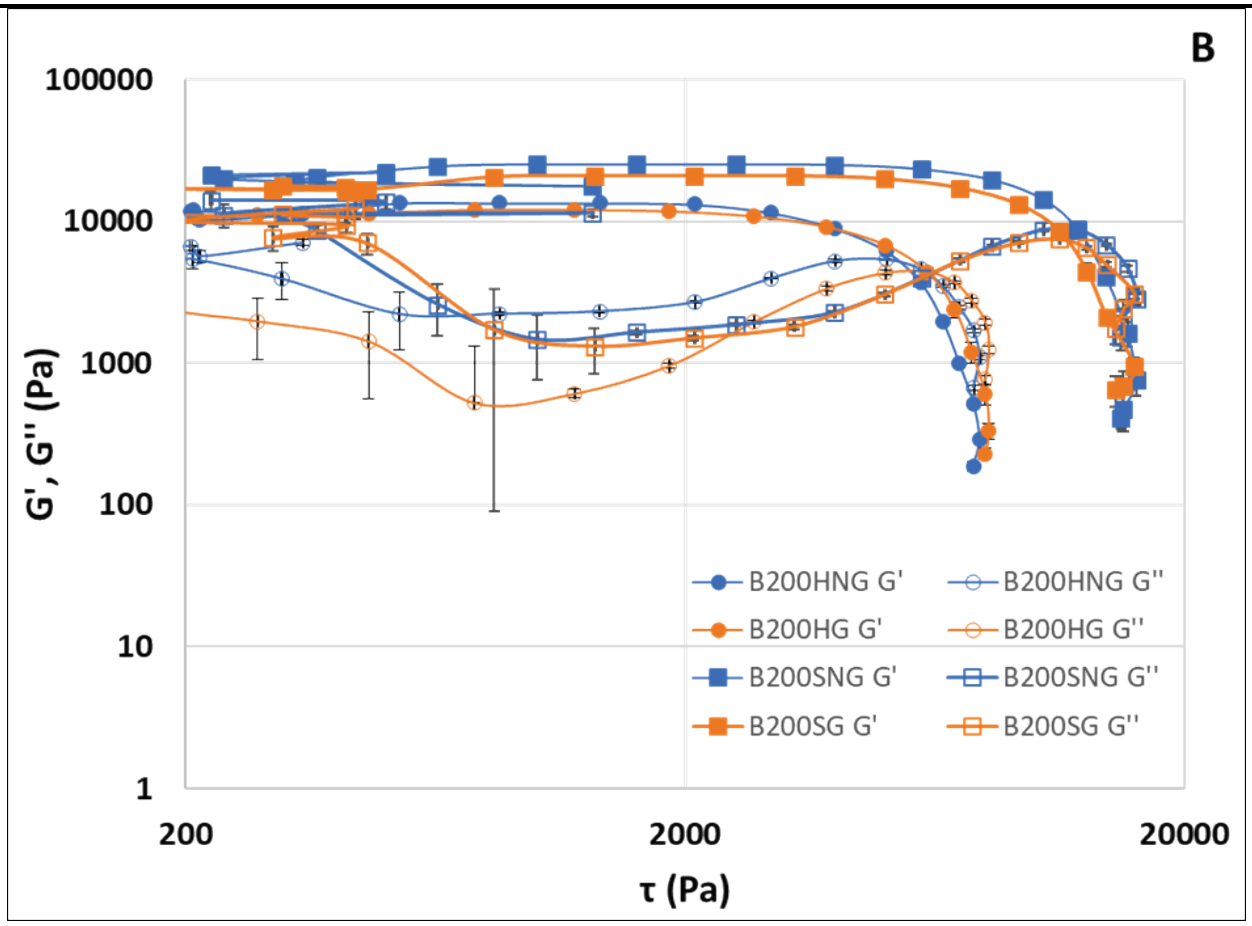


Figure 2.39. *Courbes moyennes du module de stockage (G') et du module de perte (G''). A - Courbes moyennes G' et G'' pour les conditions Bloom 125-Humide et B125-Sèche. B - Courbes moyennes G' et G'' pour les conditions Bloom 200-Humide et B200-Sèche. Ces courbes ont été calculées à partir de la moyenne de 3 répétitions, les barres d'erreur correspondant à l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

Selon Joly-Duhamel, Hellio & Djabourov, 2002), le module de conservation G' est corrélé au nombre de triple-hélices, quelle que soit la température : des valeurs de G' élevées rendent compte d'un plus grand nombre de structures en triple-hélice. Selon Bigi et al. (2004), le nombre de triple-hélices est aussi directement corrélé à la valeur de l'indice Bloom. Nos résultats indiquent que les paramètres G'max des gels B125-G et B125-NG sont significativement plus faibles que ceux des gélatines B200-G et B200-NG (**Tableau 2.22**). Ceci est cohérent avec la littérature puisque, d'après Bigi et al. (2004), les gélatines B200 doivent contenir plus de triple-hélices que les gélatines B125. Par conséquent, l'indice Bloom semble être un paramètre majeur influençant le paramètre G'max, en particulier en raison de la nature élastique du gel et de sa capacité de déformation réversible. Cependant, la glycation étant supposée renforcer la structure des matrices par des liaisons covalentes (Li, Xu & Xu, 2022 ; Nooshkam et al., 2020), les résultats obtenus pour les conditions G et NG sont plutôt inattendus. Zhao et al. (2016) ont également rapporté une diminution du module de

conservation G' dans les gels contenant de l'isolat de protéines de soja glyqué avec du glucose et du maltose, suggérant que la glycation tendait à affaiblir la structure du gel. Ils ont attribué ce résultat aux glucides environnants qui empêcheraient la dénaturation des protéines et donc la réaction de glycation, en particulier à haute température. Ce phénomène, appelé « crowding », qui augmente la thermostabilité et la stabilité au pH des protéines, a également été rapporté par Wang et al. (2021). Kuznetsova, Turoverov & Uversky (2014) ont affirmé que ce « crowding » macromoléculaire affectait la structure des protéines, le repliement ainsi que les interactions avec d'autres protéines ou macromolécules, à des concentrations variables en glucides. Sur la base des travaux de Joly-Duhamel, Hellio, Ajdari & Djabourov (2002), les résultats des **Tableau 2.20** et **Tableau 2.21** révèlent que la quantité de triple-hélices serait potentiellement plus importante dans les conditions S et NG, car les valeurs de G'max sont plus élevées. Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées en MET qui révèlent une densité d'agrégats équivalente, voire supérieure, pour la condition SNG par rapport à la condition HNG (**Figure 2.26cf**). Ces agrégats peuvent résulter de la présence de liaisons hydrogène entre les triple-hélices, formant des paquets de triple-hélices, d'autant plus que ces liaisons contribuent à stabiliser les espaces inter-hélices (Joly-Duhamel, Hellio, et al., 2002 ; Mao et al., 2022 ; Michon, Cuvelier, Relkin & Launay, 1997).

Tableau 2.22. *Effets de l'ajout de* D*-ribose en fonction du degré Bloom de la gélatine sur les paramètres rhéologiques des gels de gélatine. Deux valeurs moyennes (n = 18) (± SEM) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, en utilisant le test de Tukey (P > 0,05). Pour chaque paramètre, les comparaisons se font au sein de lignes de même couleur, deux à deux.*

		τ-croisement (Pa)	G' max (Pa)	τ-fin-LVR (Pa)
B125	**G**	6981±462[a]	12131±754[a]	3741±272[a]
	NG	7246±505[a]	15800±961[b]	3448±289[a]
B200	**G**	8849±771[a]	16062±1080[a]	4577±462[a]
	NG	8713±853[a]	19002±1424[a]	4693±486[a]

Le rôle du *D*-ribose, dans la formation de liaisons covalentes semble donc dépendant de l'état de l'ultrastructure de la gélatine à l'instant t. Une seconde hypothèse peut aussi être envisagée quant au rôle du *D*-ribose. Les valeurs de G'max étant plus élevées en condition NG, ceci pourrait refléter une meilleure capacité des gels ne contenant pas de *D*-ribose à reformer un réseau plus dense lors du refroidissement. En effet, Abuibaid et al. (2020), en travaillant avec une cinétique de refroidissement similaire à la nôtre (de 40 à 5 °C pour eux et, de 50 à 4 °C dans notre cas) ont constaté qu'un module

G' élevé reflétait une capacité accrue du gel à se replier en triple-hélices pendant les phases de refroidissement. Une explication possible serait que la présence de *D*-ribose non lié, au cours du refroidissement, pourrait perturber la reformation des triple-hélices et limiter leur stabilisation par des liaisons hydrogène inter chaînes. Le *D*-ribose pourrait alors former des liaisons hydrogène avec les triple-hélices de gélatine, interférant avec leurs liaisons inter-chaîne et empêchant le repli en structures de type triple-hélice (Wang et al., 2021). Par conséquent, la résistance des gels diminue et des structures en bobine aléatoire peuvent prédominer. Mao et al. (2022) ont suggéré que les bobines aléatoires présentes dans le gel pouvaient spontanément se réarranger en triple-hélices pendant le refroidissement. Cependant, Duconseille, Traikia et al. (2017) ont également montré que le vieillissement de la gélatine pouvait perturber cette structure, en formant des liaisons covalentes qui empêchent la reformation des triple-hélices.

Selon Gonzalez & Wess (2013), les liaisons hydrogène se forment avec toute chaîne latérale d'acide aminé polaire disponible, y compris les groupes chargés des chaînes latérales des acides aminés tels que les résidus Lysine, Arginine, Glutamate et Aspartate, et les groupes hydroxyles des chaînes latérales de la Sérine, de la Thréonine et de l'Hydroxylysine. La Lysine et l'Arginine sont les principaux acides aminés impliqués dans la réaction de glycation, et la Sérine et la Thréonine sont susceptibles de former des liaisons hydrogène. Il est donc possible qu'un gel ayant un indice Bloom élevé (encombrement stérique élevé) et la présence potentielle d'une plus grande fraction de bobines aléatoires ne favorisent pas la formation de liaisons hydrogène, à moins que la teneur initiale en eau ne soit élevée (par exemple, la condition B200-H). Une autre étude récente a également mis en évidence que les molécules d'eau étaient impliquées dans la formation de liaisons hydrogène au sein d'un réseau de gélatine (Rather, Majid et al., 2022).

En résumé, l'analyse des propriétés rhéologiques des gels montre qu'un indice Bloom de 200 améliore la résistance à la déformation des gels par rapport à un indice Bloom de 125. Cette résistance augmente encore si la gélatine a une faible teneur en eau initiale. Ceci est attribué à la présence d'un plus grand nombre de triple-hélices dans ces conditions. La réaction de glycation entraîne une diminution de la résistance des gels à la déformation, qui pourrait s'expliquer en partie par l'état de dénaturation des protéines en fonction de la température de réaction et, par le fait que le *D*-ribose perturbe la reformation des triple-hélices lors du refroidissement. Une teneur en eau élevée favorise l'accès du *D*-ribose aux acides aminés. Le module de stockage est le seul paramètre qui permet de différencier les conditions testées.

2.4. Conclusions et perspectives

Les travaux initiés autour de la glycation ont été réalisés en plusieurs étapes :

- Une revue de la littérature destinée à identifier les principaux paramètres réactionnels et les mécanismes connus à ce jour dans des matrices alimentaires, notamment d'origine carnée, qui a souligné des résultats contradictoires, des manques de connaissance et la complexité des mécanismes impliqués ;
- Un ensemble d'expérimentations préliminaires destinées à définir les paramètres réactionnels et à tester des méthodes analytiques ;
- Une approche multidisciplinaire afin de tenter de comprendre les effets de la glycation sur la texture de gels de gélatine.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la variabilité de la gélatine dans le déroulement de la réaction de glycation et, de ce fait, sur l'ultrastructure et la texture des gels fabriqués à partir de cet ingrédient.

La réaction de glycation conduit à l'apparition de conjugués colorés, dont la formation est favorisée lorsque la teneur initiale en eau de la gélatine est faible. Même si la réaction de *N*-glycation est largement mise en avant dans la littérature, il apparaît que les conjugués formés entre les résidus Sérine et Thréonine des protéines et le *D*-ribose (*O*-glycation) se produisent également au sein d'une même matrice alimentaire comme les gels de gélatine. L'effet de l'indice Bloom de la gélatine sur l'ultrastructure du gel est évident, la gélatine B200 présentant un plus grand nombre d'agrégats avant la glycation et aussi un plus grand nombre de faisceaux de triple-hélice. Cela semble affecter la glycation en créant un encombrement stérique, qui limite la capacité du *D*-ribose à accéder aux sites réactifs. En revanche, les gélatines ayant un indice Bloom plus faible (par exemple, B125), associé à une teneur en eau initiale élevée, ont présenté moins d'agrégats, ce qui suggère une structure plus colloïdale et un nombre plus faible de faisceaux de triple-hélice. Les sites réactifs sont alors plus accessibles pour la formation de liaisons covalentes, mais aussi pour les liaisons hydrogène formées par le *D*-ribose. Les changements dans l'ultrastructure de la gélatine, induits par les variations de la teneur en eau, ont donc un effet sur le déroulement de la réaction de glycation et sur la texture des gels de gélatine.

L'application concrète de la réaction de glycation pour texturer les gels de gélatine est donc

soumise à la variabilité de la matière première, qui dépend à son tour des conditions environnementales de stockage et d'utilisation. Cette étude montre l'importance du contrôle de la teneur en eau de la gélatine pour réguler la réaction de glycation, lors de son utilisation pour la texturation des aliments. Compte tenu de la quantité et de la diversité des résultats obtenus dans ce **Chapitre 2**, la **Figure 2.40** s'attache à synthétiser les résultats majeurs obtenus concernant les mécanismes de la glycation au sein de gels de gélatine, en fonction des différentes méthodes analytiques utilisées.

Enfin, étant donné la complexité des mécanismes impliqués et du travail expérimental nécessaire à leur compréhension, une approche par modélisation pourrait être envisagée. Ceci constitue une piste de travail intéressante pour notamment appliquer la réaction de glycation à d'autres matrices comme la viande, afin de développer de nouveaux aliments fonctionnels imprimés en 3D à destination de personnes présentant un déficit masticatoire. Il est pour l'heure difficile de dire si la variabilité du tissu musculaire impactera la glycation de la même façon que la variabilité rencontrée dans les gélatines. Ce travail restant à faire, le contrôle de la texture des aliments carnés par la glycation n'est donc, à ce jour, pas encore utilisable dans le domaine de l'I3D alimentaire.

SYNTHESE DU CHAPITRE 2

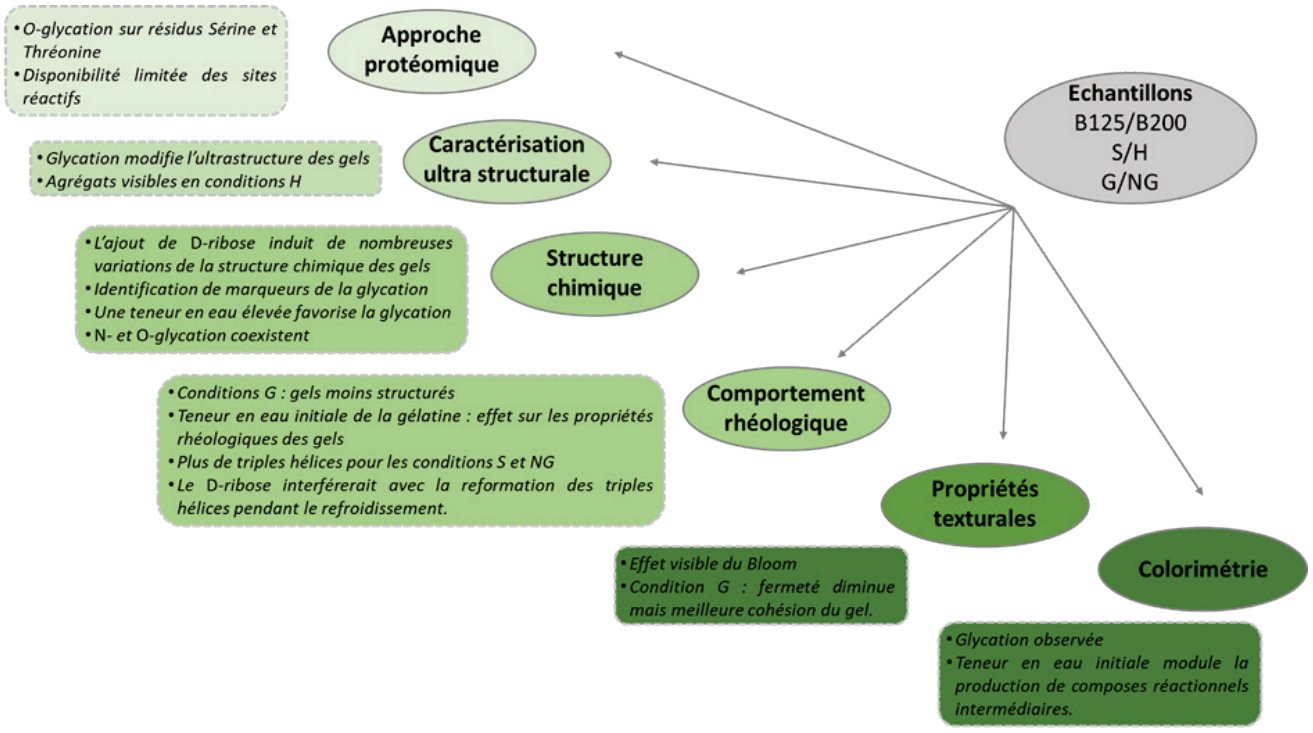


Figure 2.40. *Synthèse des principaux résultats obtenus concernant les mécanismes de la glycation au sein de gels de gélatine, en fonction des méthodes analytiques utilisées. Les conditions expérimentales varient en fonction du degré Bloom des gélatines (B125 ou B200), de la teneur en eau initiale des poudres de gélatine (Sec – S ou Humide – H) et de la présence ou l'absence de D-ribose (Glyqué – G ou Non-Glyqué – NG).*

La réaction de glycation est complexe à maîtriser et sa faisabilité est encore à évaluer pour des matrices complexes telles que la viande. Un plan d'expérience sera nécessaire pour fixer et tester les conditions expérimentales, notamment en termes de maîtrise du pH et de la température réactionnels. Des moyens alternatifs de texturation et de conception d'aliments fonctionnels peuvent être évalués afin d'avoir une action sur la texture de l'aliment de façon à faciliter sa mastication et sa déglutition. Le **Chapitre 3** va permettre de caractériser différentes formulations à base de viande d'un point de vue rhéologique.

Chapitre 3 :

Caractérisation rhéologique de formulations en vue de la conception par impression 3D d'un aliment fonctionnel riche en protéines

Une partie significative de l'état de l'art présenté ci-après est extrait d'un article de synthèse bibliographique, actuellement en cours d'évaluation dans la revue *Food Research International* :

***Portanguen, S.**, Meurillon, M., Duconseille, A., Drancourt, N., Peyron, M.A., Sicard, J., Dumoulin, C., Théron, L., Tournayre, P., Astruc, T. & Mirade, P. S. Using the glycation reaction to texturize 3D printed foods for people with oral declines: a review*.

3.1. Etat de l'art

A l'heure actuelle, les solutions offertes pour pallier les problèmes masticatoires ne sont pas satisfaisantes. En effet, proposer de la viande sous forme mixée entraîne souvent un rejet des consommateurs ; quant aux alternatives à base de produits laitiers, leur texture n'est guère satisfaisante et elles sont souvent mal acceptées. Ces aliments ont même pour effet d'aggraver la pathologie en supprimant toute sollicitation de la sphère bucco-dentaire.

La santé bucco-dentaire est un problème de portée mondiale (3,5 milliards de personnes souffrent d'affections bucco-dentaires dans le monde, (OMS, 2022), aussi bien chez des personnes jeunes (difficultés d'accès à l'hygiène, situations de handicap…) que chez des personnes plus âgées (prévalence de 29 % et 42 % selon que la population est issue d'un pays à revenu élevé ou faible, (WHO, 2016). Une des premières conséquences est la modification du régime alimentaire de ces personnes, avec, en général, une réduction drastique de la consommation de viande à cause de difficultés à mastiquer. Les carences en protéines qui s'en suivent peuvent être particulièrement pénalisantes, notamment pour les sujets âgés et, les solutions de substitution proposées à l'heure actuelle ne sont pas satisfaisantes, du point de vue nutritionnel ou organoleptique. Le **Tableau 3.1** regroupe les principales catégories d'aliments de substitution qui existent et, qui sont destinées aux populations présentant des déficiences masticatoires.

Tableau 3.1. *Exemples d'aliments hyper-protéinés alternatifs disponibles dans le commerce et destinés aux personnes présentant des troubles de la mastication.*

Nom commercial	Texture	Composition (%)	Type de protéines	Recommandations	Sources
Cake citron	Gâteau moelleux	P:33; L: 13; G: 24	Protéines de lait	25g/j (pour 60 kg de masse corporelle)	https://www.cyberparapharmacie.com/
Nutricia Fortimel	Liquide/ crème	P: 3.9; L: 0; G: 25	Protéines de lait	200-400 mL/j	https://www.nutricia.fr/
Nutricia Fortimel	Jus	P: 14.6; L: 9.6; G: 33.6	Protéines de lait	200-600 mL/j	
Delical nutra cake	Biscuits	P: 16-17.5; L: 30-35; G: 49-52	Protéines de lait	3 biscuits/j au petit-déjeuner	https://eurekasante.vidal.fr/
Nutrisens Cremeline	Crème	P: 9.6	Protéines de lait	1–3 x 125/j	https://www.nutrisens.com/
Brioche bun	Brioche	P: 9.6	Non spécifié	En tant que repas ou snack	

avec P = protéines, L = lipides, G = glucides.

A la lecture des données de ce tableau, deux constatations s'imposent : 1) les protéines d'origine musculaires sont absentes, et 2) la texture n'est pas une grandeur mise en avant. Concernant le premier point, les besoins en protéines, notamment des personnes âgées, sont clairement définis, tant qualitativement que quantitativement. En effet, les produits animaux sont reconnus comme étant une meilleure source de protéines que les végétaux (y compris les légumineuses), notamment en termes de composition en acides aminés, mais aussi en termes de digestibilité (Li, He, Li, Li, Lu & Li, 2020). Ceci est dû à leur composition complète en acides aminés (tous les acides aminés essentiels sont présents), ainsi qu'à leur plus haute digestibilité (>90 %) et une meilleure biodisponibilité. Par exemple, la viande de bœuf possède un score PDCA (Protein Digestibility Corrected Amino Acid) de 1,00, c'est-à-dire le maximum, alors que des produits végétaux tels que le soja, les pois, l'avoine ou le blé entier ont des scores respectifs de 0,91 ; 0,67 ; 0,57 et 0,45. La consommation en protéines recommandée, en France, pour un individu adulte est de 0,83 g/kg/j minimum. Cette recommandation passe à 1,00 g/kg/j pour les personnes de plus de 60 ans (ANSES, 2019). D'après Donaldson et al. (2018), pour stimuler l'anabolisme musculaire chez un individu en bonne santé, il est recommandé d'apporter la quantité de protéines journalière en 2 à 3 prises contenant chacune 25 à 30 g de protéines. Cette donnée est importante dans le cas des personnes âgées présentant des difficultés masticatoires, car des compléments alimentaires texturés pourraient alors être consommés en parallèle des repas. Quant à la texture, cette dernière est rarement prise en compte lors du développement des aliments protéiques de substitution. Les substituts protéiques présentés dans le Tableau 3.1 sont

essentiellement des produits crémeux, voire liquides, ou des produits céréaliers. Ces aliments seront peu mastiqués lors de leur consommation.

La littérature fait état de plusieurs travaux visant à concevoir des aliments à base de viande présentant une texture modifiée et destinés aux personnes âgées. La texture de ces produits est souvent souple et a été modifiée suite à l'ajout de particules de petite taille (Gallego, Barat, Grau & Talens, 2022). Par exemple, la viande hachée est souvent associée à des hydrocolloïdes, des épaississants, des graisses, des gélifiants ou des liants, dont l'ajout a pour objectif de redonner une texture satisfaisante au produit carné, la texture initiale de la viande ayant été perdue suite au hachage (Gujral, Kaur, Singh & Sodhi, 2002). La technologie innovante d'I3D a récemment été utilisée pour développer des produits à base de viande, mais là encore, moyennant l'utilisation d'agents texturants pour conférer à l'aliment les propriétés souhaitées (Chao, Hwang, Kim, Choi, Kim & Park, 2022 ; Dick, Bhandari, Dong & Prakash, 2020). Bien que tous ces aliments à texture modifiée aient été conçus pour permettre une mastication confortable et une déglutition sûre pour les personnes âgées (Cichero, 2016), la plupart d'entre eux ne satisfont pas les critères de naturalité actuellement en vigueur et peuvent même être contre-indiqués dans le cas de certains régimes alimentaires imposés par des pathologies telles que le diabète ou l'hypercholestérolémie.

Toutefois, des travaux alternatifs existent, comme ceux de Farouk et al. (2018) qui ont montré qu'il était possible d'incorporer des protéines animales dans différents aliments. En effet, l'incorporation de poudre de viande rouge (lyophilisée) dans du pain, des pâtes, des yaourts, de la crème glacée ou du chocolat a permis d'augmenter jusqu'à 28 % le taux de protéines de ces aliments, tout en conduisant à une bonne acceptabilité sensorielle de ces produits auprès des consommateurs. Cette étude illustre parfaitement les « innovations produits » susceptibles d'être mises au point, en appliquant de nouveaux procédés. Néanmoins, il est possible d'aller encore plus loin, en repensant totalement l'aliment afin de maîtriser sa texture et sa géométrie en vue de l'adapter à la forme de la cavité buccale d'un consommateur/patient, à une pathologie particulière ou à un déficit de la mastication.

3.1.1. Mécanismes de la mastication et adaptation de l'alimentation

La mastication est une activité sensori-motrice complexe réalisée dans la cavité buccale, où les dents travaillent avec la langue et la salive pour former un bol alimentaire. Celui-ci doit présenter des caractéristiques précises pour une déglutition sûre. La mastication est une activité rythmique

coordonnée qui s'adapte à la fois aux caractéristiques de l'aliment et aux caractéristiques bucco-dentaires de l'individu, comme son âge et son état dentaire (Woda, Foster, Mishellany & Peyron, 2006). Le rythme de base de la mastication est défini par le système nerveux central qui coordonne les commandes motrices des muscles masticateurs. Au cours de la séquence masticatoire, l'aliment est désagrégé et fragmenté ; les fragments formés sont mélangés à la salive pour produire un agglomérat sûr pour la déglutition : le bol alimentaire. Les caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire évoluent continuellement pendant sa formation jusqu'à sa déglutition. La perception de ces caractéristiques permet une adaptation précise et permanente des commandes motrices par le système nerveux central. Au cours de cette transformation alimentaire, des informations sensorielles sont recueillies par des récepteurs oraux situés dans la bouche et utilisées pour adapter le processus masticatoire, par exemple, en termes de force musculaire développée, d'activité de la langue ou de besoin en salive afin de former le bol alimentaire (Peyron, Lassauzay & Woda, 2002).

3.1.1.1. Effet du vieillissement sur la mastication

Comme toutes les parties du corps, les structures et les fonctions de la zone buccale subissent des changements physiologiques et un déclin général lié au vieillissement, qui peuvent également se combiner ou interagir avec d'autres pathologies ou traitements médicaux. Chez les sujets âgés en bonne santé, il est observé une diminution de la force de morsure maximale ainsi que de la masse musculaire, parfois accompagnées d'une diminution de l'activité de la langue et du flux salivaire (Machida et al., 2017). L'activité de la langue et la pression langue-palais sont également réduites chez les personnes âgées, probablement parce que la perte du contrôle moteur et de la sensibilité de la langue se cumule avec la sarcopénie de la langue, voire potentiellement avec un déclin de la fonction de déglutition (Kunieda et al., 2021). Néanmoins, un vieillissement normal et sain, *i.e.* sans perte de dents ni d'altération buccale drastique, permet de maintenir une fonction masticatoire correcte. Une adaptation du nombre de cycles masticatoires sans modification de la contraction musculaire a alors lieu (Peyron, Blanc, Lund & Woda, 2004 ; Peyron, Woda, Bourdiol & Hennequin, 2017). Ainsi, dans le cas d'un vieillissement en bonne santé, la fonction masticatoire est encore capable d'adapter les activités motrices à ce qui se passe dans la bouche et de les ajuster correctement aux propriétés mécaniques de l'aliment mâché.

3.1.1.2. Effet de la perte de dents et des facteurs liés à l'âge sur les fonctions buccales

La combinaison du déclin oral normal est associée à d'autres facteurs tels que les dents manquantes, la réhabilitation dentaire, la malocclusion[18] ou divers troubles bucco-dentaires. Ces facteurs peuvent affecter de manière significative la performance masticatoire, avec de fortes conséquences sur la prise alimentaire, la formation du bol alimentaire et, donc la nutrition (N'Gom & Woda, 2002 ; Peyron et al., 2017). La perte de dents est le principal facteur affectant le processus de mastication (Jalabert-Malbos, Mishellany-Dutour, Woda & Peyron, 2007). Un minimum de 20 dents est généralement admis critère permettant de maintenir une fonction masticatoire efficace et une nutrition adéquate, ce qui peut être problématique pour beaucoup de personnes âgées, vu la prévalence élevée de l'édentation partielle, voire parfois totale, dans cette frange de la population (Schimmel, Christou, Miyazaki, Halazonetis, Herrmann & Muller, 2015). Une littérature abondante a documenté les troubles de la mastication chez les porteurs de prothèses dentaires. L'édentation prive la cavité buccale de nombreux récepteurs associés aux dents, ce qui entraîne une perturbation et une désorganisation supplémentaires des mécanismes neuromusculaires contrôlant la mastication (Ferrario, Sforza, Zanotti & Tartaglia, 2004). Comme indiqué *supra*, une mauvaise mastication est souvent compensée par un allongement de la séquence masticatoire (augmentation du nombre de cycles masticatoires), ce qui entraîne une augmentation de l'effort buccal, mais aussi, une incapacité à s'adapter aux caractéristiques du bol alimentaire (Veyrune, Lassauzay, Nicolas, Peyron & Woda, 2007). Cela signifie que l'objectif de la mastication n'est pas atteint, puisque le bol alimentaire ne répond pas aux critères d'une déglutition sûre. Une étude sur des porteurs de prothèses complètes a mis en évidence une forte proportion de grosses particules dans le bol alimentaire, le rendant insuffisamment fragmenté et dangereux pour la déglutition (Peyron, Sante-Lhoutellier, Francois & Hennequin, 2018). Lors de la phase de déglutition, cette situation constitue un double danger pour les personnes âgées édentées, car à l'impossibilité de stabiliser la mandibule, ce qui est indispensable pour une déglutition sûre, s'ajoute la déglutition de gros fragments alimentaires, d'où un risque accru d'aspiration et de suffocation (Yoshikawa, Yoshida, Nagasaki, Tanimoto, Tsuga & Akagawa, 2006). La présence de pathologies neurodégénératives, fréquentes chez les personnes âgées, peut aussi

[18] Mauvaise relation entre les dents. En théorie, cela réfère à toute déviation ou variation d'une occlusion normale ou idéale.

accroître le risque de dysphagie[19] (Nagaya, Kachi, Yamada & Sumi, 2004).

L'augmentation des seuils sensoriels dans la perception du goût et de l'odorat est couramment observée chez les personnes âgées. Ces déficits sont observés dans le cadre d'un vieillissement normal, mais sont également décrits dans le contexte de certaines maladies, d'expositions environnementales ou dans le cas de prise de médicaments (Schiffman, 1997). L'effet du vieillissement, en tant que tel, est difficile à établir, en raison de ces multiples facteurs, mais la perte des dents chez les personnes âgées pourrait être un des facteurs explicatifs du déclin des sens chimiques (Boucher, Berteretche, Farhang, Arvy, Azérad & Faurion, 2006). En effet, un lien a déjà été établi entre la dégradation des aliments lors de la mastication et la perception du goût (Neyraud, Peyron, Vieira & Dransfield, 2005), ce qui conforte l'hypothèse d'un effet négatif de la perte des dents sur la perception du goût.

3.1.1.3. Conséquences des carences bucco-dentaires sur la nutrition des personnes âgées

Il existe de nombreuses preuves que la santé bucco-dentaire joue un rôle dans la nutrition ; en conséquence, de nombreux effets négatifs liés à une mauvaise santé bucco-dentaire et à des troubles de la mastication ont déjà été observés chez les personnes âgées (N'Gom & Woda, 2002). L'état nutritionnel étant directement lié à l'adéquation entre la consommation alimentaire et les besoins nutritionnels, un mauvais état de la fonction bucco-dentaire est clairement un obstacle à une « bonne » nutrition, car il a un impact, à la fois, sur le choix des aliments et sur leur traitement au cours de la mastication.

La cavité buccale constitue le premier compartiment du tube digestif, dont l'objectif est de préparer les aliments ingérés à une digestion et à une absorption optimale des nutriments. La malnutrition protéino-énergétique est fréquente chez les personnes âgées, dont la régulation énergétique est altérée et dont l'apport en protéines est insuffisant pour couvrir les besoins minimaux. Il en résulte souvent une diminution de la masse musculaire (sarcopénie). Une mauvaise santé bucco-dentaire et une mastication déficiente sont responsables d'une efficacité réduite au moment de la libération des nutriments du bol alimentaire, d'une exposition réduite aux enzymes salivaires, d'une digestion retardée et non optimisée pour l'absorption des nutriments, ainsi que d'un déficit de la perception sensorielle pendant la phase orale de la transformation des aliments. A cause d'une

[19] La dysphagie se définit comme une difficulté à la déglutition. Le trouble résulte d'une anomalie du transport des aliments liquides et/ou solides, du pharynx à l'estomac.

fonction buccale altérée, les personnes ayant des difficultés à mâcher modifient généralement leur choix d'aliments (Tada & Miura, 2014), passant d'aliments difficiles à mâcher à des aliments faciles à mâcher ou moins collants. Ces personnes évitent donc de nombreux groupes d'aliments tels que les légumes crus ou le pain dur, ainsi que la viande qui est très souvent difficile à mastiquer sans effort (Peyron et al., 2018). Ces difficultés à mâcher un produit carné entraînent également des répercussions sur la cinétique et l'optimisation de la digestion de la viande chez les personnes âgées (Peyron et al., 2021).

Il existe une abondante littérature sur les difficultés de mastication et de déglutition. Les expériences visant à concevoir de nouvelles textures d'aliments à destination des personnes âgées sont de plus en plus nombreuses, mais les approches utilisées ne prennent pas en compte le degré de déficience masticatoire et orale, alors qu'il est très important que la texture des aliments proposés soit en parfaite adéquation avec les capacités orales.

3.1.2. Les aliments fonctionnels

Ce concept, défini par Roberfroid (2000), appartient au domaine de la nutrition et non à la pharmacologie. Il n'existe pas de définition réglementaire des aliments fonctionnels (Martin, 2008), mais certains avis peuvent être émis par l'ANSES dans le cas d'aliments ciblés. Cependant, la réglementation encadre de façon très précise les aliments fonctionnels, ne serait-ce que par l'ensemble des éléments relatifs aux aliments classiques, mais aussi de façon plus précise, notamment pour leur conception : 1) ce qu'il est possible d'utiliser pour concevoir un aliment fonctionnel, 2) les éléments de composition qu'il doit respecter pour pouvoir porter une allégation, et 3) les allégations qui peuvent être utilisées lors de toute communication à caractère commercial (Martin, 2008). Le règlement 1924/2006 précise la définition d'une allégation, en s'appuyant sur les travaux du *Codex Alimentarius*. Une allégation est définie comme « *tout message ou toute représentation, non obligatoire en vertu de la législation communautaire ou nationale, y compris une représentation sous la forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, quelle qu'en soit la forme, qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières* ». Deux types d'allégations sont possibles :

- Les allégations nutritionnelles qui font référence à la teneur en énergie ou en un (ou plusieurs) nutriment particulier ;
- Les allégations de santé qui recouvrent tous les autres types d'allégations.

Les aliments fonctionnels sont et, doivent être des aliments et non des médicaments. Ils n'ont pas à avoir d'effet thérapeutique, leur rôle étant avant tout préventif. C'est dans ce contexte général que l'action concertée de « *The European Commission Concerted Action on Functional Food Science (FUFOSE) »*, coordonnée par « *The International Life Sciences Institute (ILSI Europe) »*, s'est réunie, en 1996, pour parvenir à un consensus autour des concepts scientifiques relatifs aux aliments fonctionnels, qui a ensuite été publié en 1998. L'ensemble des aliments fonctionnels doit être considéré comme un concept et non comme un groupe d'aliments. Les caractéristiques uniques d'un aliment fonctionnel sont les suivantes :

- Être un aliment conventionnel ou quotidien ;
- Être consommé dans le cadre d'un régime alimentaire normal ou habituel ;
- Être constitué de composants d'origine naturelle (par opposition à des composants synthétiques) qui peuvent être présents à des concentrations non habituelles dans les aliments ou normalement absents ;
- Avoir un effet positif sur la ou les fonction(s) cible(s), au-delà de la valeur nutritive de base ;
- Pouvoir améliorer le bien-être et la santé et/ou réduire le risque de maladie ou fournir un avantage pour la santé, de manière à améliorer la qualité de vie, y compris les performances physiques, psychologiques et comportementales ;
- Posséder des propriétés légales et scientifiquement fondées.

Un aliment peut être qualifié de fonctionnel s'il est démontré, de manière satisfaisante, qu'il a un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme, au-delà des effets nutritionnels adéquats, d'une manière qui se rapporte à l'amélioration de la santé et du bien-être et/ou à la réduction du risque de maladie. Il ne doit pas être ingéré sous forme de pilules ou de gélules et doit s'intégrer dans le régime alimentaire normal. La fonctionnalité de l'aliment peut être personnalisée, elle ne doit donc pas nécessairement s'appliquer à une population globale. D'un point de vue pratique, un aliment fonctionnel peut être :

- Un aliment naturel ;
- Un aliment auquel un composant a été ajouté ;
- Un aliment dont un composant a été retiré ;
- Un aliment dont la nature d'un ou de plusieurs composants a été modifiée ;
- Un aliment dans lequel la biodisponibilité d'un ou de plusieurs composants a été modifiée ;

- Toute combinaison des possibilités précédentes.

Il apparaît donc que, dans le cadre de cette thèse, l'utilisation du terme « aliment fonctionnel » est abusive, car il ne sera pas possible de déterminer l'impact nutritionnel d'un tel aliment dans le temps imparti. Néanmoins, ce travail se veut être une preuve de concept quant à la faisabilité de mise en œuvre d'une méthode de fabrication d'aliments par I3D alimentaire.

3.1.2.1. Aliments fonctionnels et formulation

Trois approches existent dans la littérature concernant la mise en œuvre d'aliments fonctionnels.

Tout d'abord, l'essentiel des aliments fonctionnels est conçu sur la base de modifications de la formulation, le plus souvent suite à l'ajout d'une substance active. Nous pouvons citer en exemple les travaux de Gullón, Gagaoua, Barba, Gullón, Zhang & Lorenzo (2020) sur des algues marines, destinés à développer de nouveaux aliments à base de viande. L'extraction de composés à partir de ces algues (polysaccharides, protéines/peptides, composés phénoliques, pigments, acides gras, vitamines, minéraux) par différentes procédés (ultra-sons, micro-ondes, utilisation d'enzymes…) permet d'envisager des stratégies de reformulation pour améliorer la sécurité sanitaire (en limitant l'oxydation par la modification du profil lipidique), ou les propriétés organoleptiques, nutritionnelles et texturales. Cependant, des limites persistent notamment en termes de type et de quantité d'extrait d'algues à utiliser en complément des matrices carnées.

Parfois, seul un ingrédient est qualifié de fonctionnel au sein d'une préparation. C'est le cas, par exemple :

- Du riz séché et traité par des enzymes, pour en améliorer les qualités organoleptiques et structurantes (Sapna & Jayadeep, 2023) ;
- De la poudre et du concentré de myrtille, incorporés dans des produits laitiers, afin d'en augmenter l'activité antioxydante en présence de probiotiques (Hurtado-Romero et al., 2023).

Une troisième approche consiste à établir des protocoles, voire des stratégies, pour la conception d'aliments fonctionnels par *design thinking*[20], à l'image des travaux de (Tkaczewska et al.,

[20] Le *design thinking* est une approche de l'innovation centrée sur l'humain. Il s'agit d'une méthode ou d'un process de conception globale, centré sur l'utilisateur, en vue de réaliser des services ou produits innovants.

2021). Cette méthode de conception, déclinée en douze étapes, a été conçue pour concevoir un aliment à haute valeur nutritionnelle présentant un pouvoir antioxydant élevé (dattes et hydrolysats de coproduits de poisson) (**Figure 3.1**). Selon ces auteurs, trois aspects principaux sont à prendre en compte pour la méthode de *design thinking* : l'empathie du consommateur, la visualisation de l'aliment et une collaboration entre les différents acteurs lors du processus de conception.

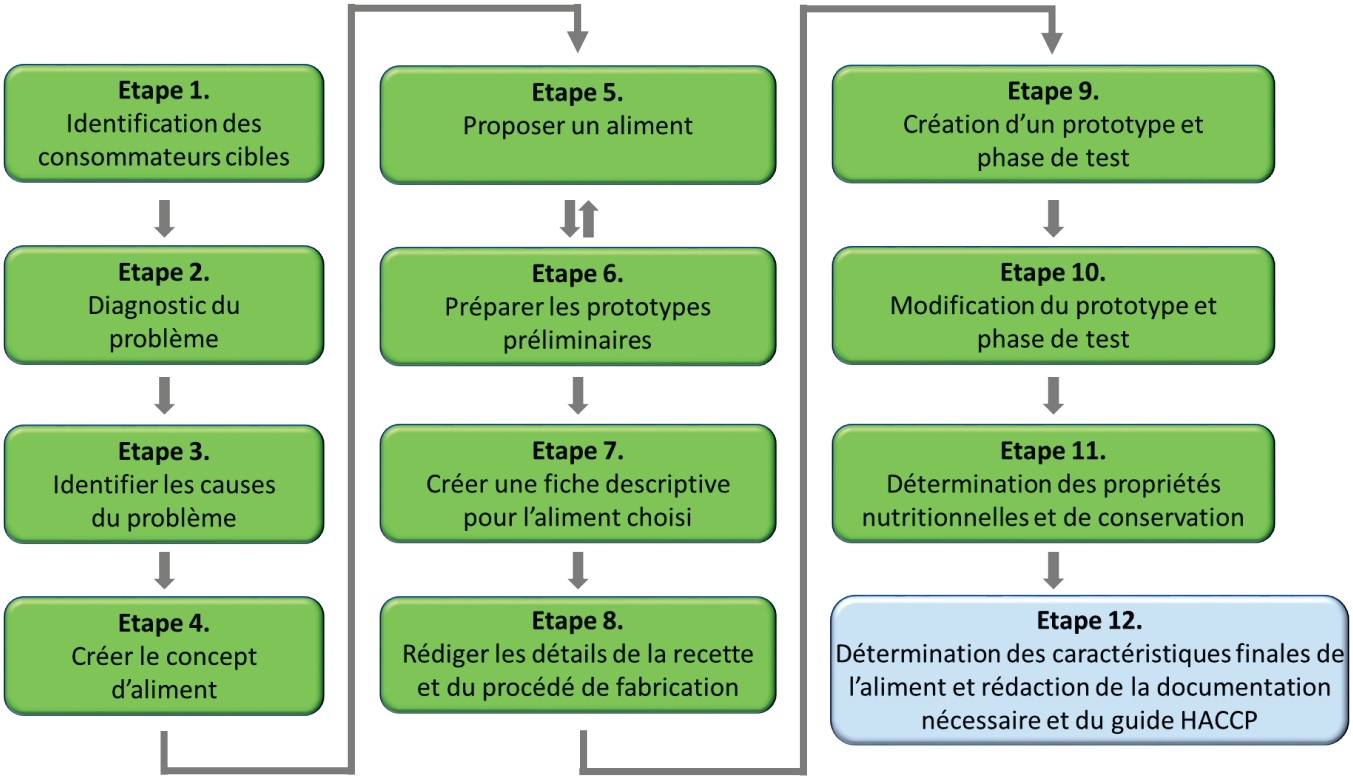


Figure 3.1. *Représentation simplifiée de la procédure de conception d'un aliment fonctionnel établie par Tkaczewska et al. (2021).*

3.1.2.2. Aliments fonctionnels et impression 3D

La conception d'aliments fonctionnels par I3D offre de nouvelles perspectives en termes de fonctionnalités. Il est toutefois nécessaire de séparer les études portant sur la restructuration d'aliments par impression, des études traitant réellement d'aliments fonctionnels imprimés. Dans ce dernier cas, la littérature scientifique est relativement peu fournie, même si des travaux en soulignent le potentiel (Jagadiswaran, Alagarasan, Palanivelu, Theagarajan, Moses & Anandharamakrishnan, 2021 ; Donn, Prieto, Mejuto, Cao & Simal-Gandara, 2022). L'évaluation de la qualité nutritionnelle au moyen d'études cliniques ainsi que l'évolution de ces produits au cours de la conservation sont encore très mal connues et nécessitent de nouvelles investigations (Tomašević et al., 2021). Un certain

nombre d'études, à l'instar de celle de (Azam, Zhang, Bhandari & Yang, 2018), s'intéressent au comportement physique de l'aliment après impression. Ce comportement va dépendre de la matrice utilisée (des hydrocolloïdes dans leur cas) et va conditionner l'accessibilité des nutriments, comme des vitamines ajoutées, notamment en lien avec les caractéristiques de mastication. Dans ce cas, une augmentation de la cohésion de l'aliment (mesurée par TPA) a été considérée comme bénéfique dans le cas de gommes alimentaires, surtout au niveau de la sensation en bouche (Azam et al., 2018).

Afin de concevoir des aliments à base de viande adaptés à des personnes souffrant de dysphagie, (Dick et al., 2020) ont aussi utilisé des hydrocolloïdes. Cependant, à la différence des travaux de Azam et al. (2018), ceux-ci étaient destinés à réduire la fermeté et la cohésion des échantillons à base de viande pour en faciliter la mastication. L'ajout de ces hydrocolloïdes a influencé le comportement rhéologique des aliments, en tendant vers des propriétés élastiques. Ce changement de comportement a été expliqué par l'apparition de cavités de taille hétérogène, suggérant un pouvoir de rétention en eau supérieur.

La texture d'un aliment est, comme nous l'avons montré tout au long de ce travail, un élément fondamental pour les personnes rencontrant des difficultés de mastication. Elle constitue donc une des principales fonctionnalités à contrôler dans un aliment, dans le cas de la conception d'aliments par I3D. La formulation reste l'angle d'approche le plus couramment utilisé pour modifier cette texture, mais la géométrie de l'aliment, interne et externe, est aussi une voie d'optimisation à développer. La densité et le motif de remplissage sont des paramètres importants à prendre en compte, ceux-ci vont conditionner en grande partie la sensation en bouche, notamment après cuisson.

En effet, la modification de la structure d'un aliment lors de l'I3D, suite, par exemple, à une modification de la densité du remplissage, influence les propriétés texturales. Il s'agit d'un concept relativement nouveau dans le domaine de l'I3D. Peu d'études établissent un lien entre la qualité des structures internes des aliments imprimés en 3D, leurs propriétés texturales et leur qualité globale (Zhao et al., 2020). Huang, Zhang & Bhandari (2019) ont rapporté que les propriétés de texture, comme le collant et la fermeté, de riz brun imprimé en 3D étaient directement corrélées à la densité de remplissage. Afin d'améliorer la stabilité et la résistance mécanique de la structure, il s'est avéré essentiel de déposer une quantité appropriée de matière et de contrôler la fraction de vide dans la structure interne des produits imprimés en 3D.

Le type de structure de remplissage des objets imprimés en 3D affecte également de manière significative leur résistance mécanique et leur stabilité. En utilisant comme matière première du chocolat noir du commerce, Mantihal et al. (2017) ont testé la résistance à la rupture de trois formes

hexagonales imprimées : 1) avec supports croisés, 2) avec supports parallèles, et 3) sans support (**Figure 3.2**). Ces auteurs ont montré que les structures hexagonales avec supports croisés étaient plus stables (nécessitant une force plus élevée pour la rupture) que celles sans supports ou avec supports parallèles.

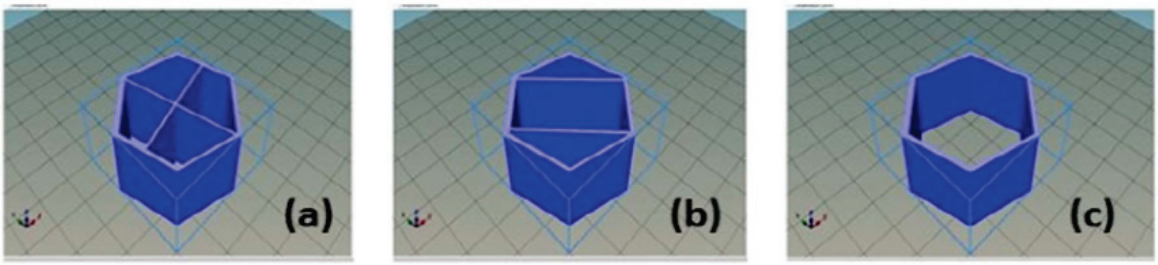


Figure 3.2. *Différents types de structure de remplissage de formes hexagonales imprimées en chocolat par (Mantihal et al., 2017) pour l'étude des propriétés mécaniques : A – avec supports croisés ; B – avec supports parallèles ; C – sans support.*

Severini & Derossi (2016) ont conçu une structure de support similaire pour imprimer des produits céréaliers sous forme de pâte. La résistance à la rupture des échantillons était fortement liée au niveau de remplissage, bien qu'une variabilité significative ait résulté de la hauteur des couches utilisées pendant l'impression 3D. Les résultats de Varvara, Szabo & Vodnar (2021) ont mis en évidence une relation linéaire entre le pourcentage de remplissage et la fermeté de produits à base de maïs, d'igname ou de pomme de terre, après une cuisson par friture. De même, Huang, Zhang, Bhandari & Liu (2019) ont rapporté qu'une structure alimentaire 3D imprimée présentait, à niveau de remplissage constant, d'importantes différences de fermeté lorsque les géométries de remplissage étaient différentes. Ces différents résultats montrent que la structure interne joue un rôle important dans la fermeté et l'intégrité du produit imprimé en 3D et, peut donc constituer un levier potentiel pour ajuster les propriétés texturales des produits alimentaires. La relation entre le type et le pourcentage de remplissage a été étudiée par Mantihal, Prakash, Godoi & Bhandari (2019). A partir de structures en chocolat (**Figure 3.3**), ces auteurs ont mis en évidence qu'une structure en « nid d'abeille » permettait de déposer une quantité de matière plus élevée que pour les autres motifs et que les zones vides étaient significativement différentes entre les trois motifs, notamment à cause du chevauchement entre les couches et du caractère irrégulier de la matrice extrudée. Les motifs en « étoile » et en « nid d'abeille » ont conduit à des propriétés mécaniques plus élevées que le motif en « courbe de Hilbert », en raison de l'intégration croisée des motifs.

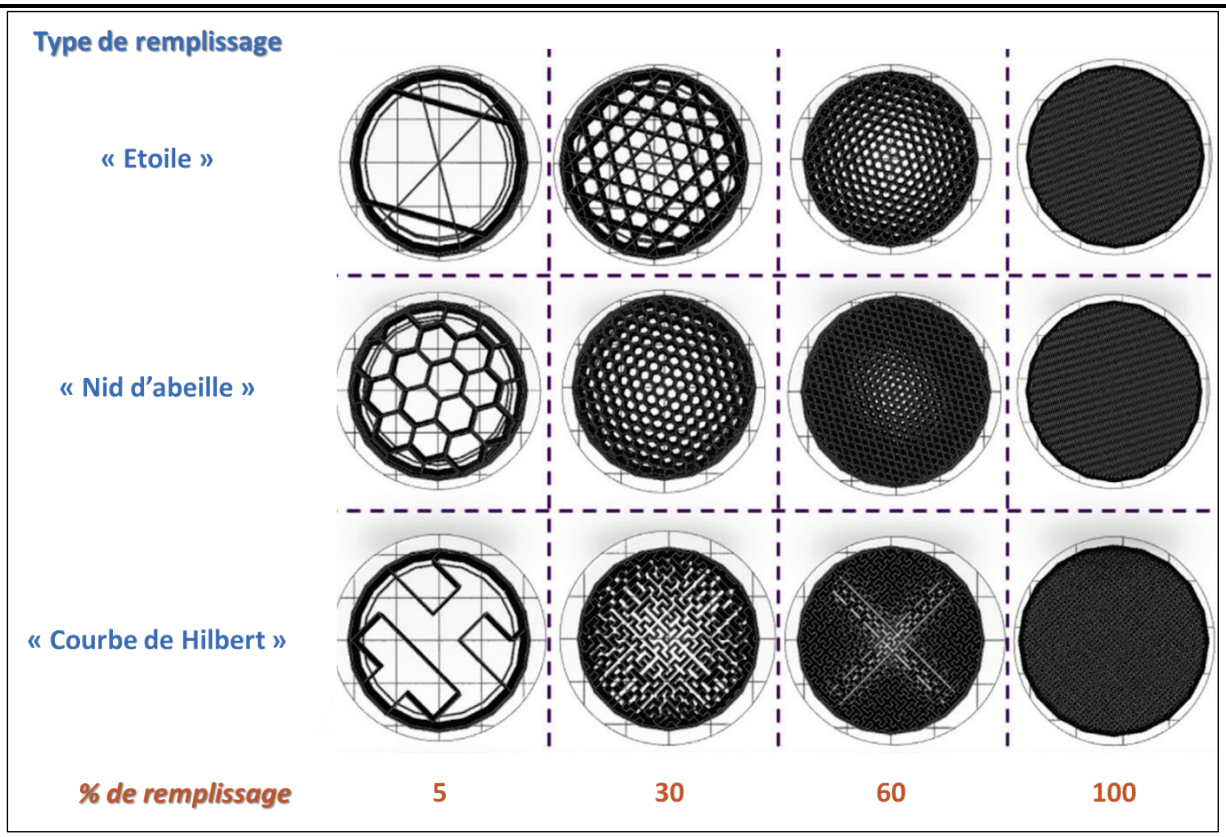


Figure 3.3. *Modélisation numérique de différents motifs, à différents pourcentages de remplissage interne, utilisés pour imprimer des structures en chocolat (d'après Mantihal et al., 2019).*

L'amélioration des propriétés de texture et de la qualité globale des aliments imprimés au travers d'une modification de la densité de remplissage ont des applications pratiques. En effet, Fanli Yang, Guo, Zhang, Bhandari & Liu (2019) ont rapporté que lorsque la densité de remplissage d'un gel à base de jus de citron imprimé en 3D était de 100 %, le matériau se déformait à cause d'un phénomène de gonflement. Un taux de remplissage de 90 % assurait une planéité d'impression optimale, tandis que des taux compris entre 60 et 80 % conduisaient à une porosité élevée.

De plus, il a été constaté que la densité de remplissage affectait la quantité de vides internes et la stabilité des aliments imprimés après la phase de post-traitement, ce qui a pour conséquence d'affecter aussi la texture des produits cuits (Dick et al., 2019a). De nouveau, un motif de remplissage en « nid d'abeille » a entraîné une meilleure stabilité structurelle après chauffage qu'un simple remplissage de type « concentrique ».

3.1.3. Une nouvelle approche pour un aliment fonctionnel : les substituts salivaires

La salive est un élément essentiel pour les phénomènes de mastication et de déglutition puisqu'elle assure une lubrification optimale de la cavité buccale. Elle permet aussi d'aider à la digestion (elle contient des enzymes telles que l'amylase) et joue un rôle majeur dans la perception du goût, mais également pour l'élocution, l'hydratation de la muqueuse buccale et, sa circulation contribue au nettoyage de la cavité buccale (Alhejoury et al., 2021). Une baisse de la production de salive (hyposialie) est souvent la cause de problèmes physiologiques tels que des problèmes de mastication, un blocage de la déglutition et de la perception des goûts.

La xérostomie est une sensation subjective de sécheresse buccale liée à d'éventuelles modifications quantitatives et qualitatives de la composition de la salive. Elle doit être différenciée de l'hyposialie qui résulte d'une mesure objective de la réduction du débit salivaire (Łysik et al., 2019). Les causes de la xérostomie sont multiples et peuvent être liées ou non à des déficiences de production de salive. Elle peut résulter de maladies salivaires (traumatisme des glandes salivaires, tumeur, chirurgie ou radiothérapie), d'effets induits par des maladies chroniques systémiques (diabète sucré, troubles auto-immuns, *etc*.), d'une déshydratation, d'une respiration par la bouche ou d'effets indésirables liées à certains médicaments (Piaton, Duconseille, Roger-Leroi & Hennequin, 2021).

La prévalence de la xérostomie peut varier de 8 à 42 %, tandis que la prévalence de l'hyposialie se situe entre 12 et 47 % (Hopcraft & Tan, 2010). Pour la xérostomie, cette prévalence passe à 50 % chez les personnes âgées (Furness et al., 2011). Environ 54 % des personnes se plaignant de xérostomie présentent des preuves objectives d'hypo-salivation, après la mesure du débit salivaire (Longman et al., 1997).

Les substituts salivaires visent à atténuer les symptômes de la xérostomie, ils n'ont pas d'effet sur la production de salive et sont indiqués pour tous les patients souffrant de xérostomie, y compris ceux souffrant d'hyposialie. Les substituts salivaires, également appelés « salive artificielle », visent essentiellement à hydrater les tissus buccaux. Leurs caractéristiques biologiques et physiques doivent être aussi proches que possible de celles de la salive humaine. La salive artificielle est généralement un mélange d'agents tampons, de dérivés de cellulose et d'arômes. Ces substituts sont disponibles sous forme liquide, huileuse, en spray, en gels, ou bien encore en tant que bains de bouche, de gommes à mâcher ou de dentifrice (Alhejoury et al., 2021). La viscosité d'une salive, considérée

comme normale, est telle qu'elle correspond au comportement d'un fluide non-Newtonien[21] (Marcinkowska-Gapinska, Linkowska-Swidzinska, Swidzinski & Surdacka, 2018). Cette caractéristique assure l'agrégation du bol et la lubrification des muqueuses buccales et laryngées pendant la transformation orale des aliments (FOP – *Food Oral Processing*). Il est alors raisonnable de penser qu'un substitut salivaire devrait se comporter comme un fluide non-Newtonien. Cependant, parmi les 14 substituts présentés dans l'étude de Piaton et al. (2021), seuls six d'entre eux présentaient ce type de comportement. Dans la plupart des cas, les substituts salivaires non-Newtoniens contiennent des substances d'origine naturelle (macromolécules salivaires telles que des mucines[22], du lysozyme ou de la lactoferrine) qui offrent une biocompatibilité élevée. Cependant, les mucines sont d'origine porcine ou bovine, ce qui peut poser problème pour chez certaines personnes pour des raisons culturelles ou cultuelles. Le traitement de la xérostomie consiste donc à utiliser un substitut salivaire imitant toutes les propriétés de la salive naturelle afin d'améliorer le confort buccal entre et pendant les repas.

La rhéologie du bol alimentaire influence aussi grandement la mastication et la déglutition (Chen, 2007). Une autre propriété physicochimique importante de la salive est donc sa viscoélasticité, qui présente un comportement intermédiaire entre une solution visqueuse et un solide élastique. La viscoélasticité est évaluée *in vitro* à l'aide de rhéomètres.

Au cours du FOP, la salive comble progressivement les espaces entre les particules alimentaires et augmente leur cohésion. Le seuil de déglutition est défini comme le moment où le bol alimentaire atteint la force de cohésion maximale (Prinz & Lucas, 1997). Lorsque le débit salivaire est de l'ordre de 0,1-1 $L.s^{-1}$, la viscosité de la salive est plus élevée que lors de la phase de mastication (débit d'environ 60 à 160 $L.s^{-1}$).

Même si les substituts salivaires se sont avérés bénéfiques pour réduire les symptômes subjectifs associés à la xérostomie, il n'est toutefois pas prouvé qu'ils améliorent, *in fine,* l'état nutritionnel du patient. Toutefois, la question reste ouverte car la salive joue un rôle prépondérant dans le maintien de la santé buccale et dans la transformation orale des aliments. Le FOP couvre toutes les fonctions d'ingestion et comprend également la succion, la morsure, la mastication, la manipulation des aliments avec la langue et la déglutition. La sécheresse buccale affecte à la fois la phase préparatoire et la phase de déglutition et, peut entraîner une altération de la formation du bol et de son transport

[21] On appelle fluide Newtonien un fluide dont la loi contrainte/vitesse de déformation est linéaire. La constante de proportionnalité est appelée viscosité (Couarraze & Grossiord, 2000).

[22] Une mucine est une protéine de haut poids moléculaire fortement glycosylée et entrant dans la composition de nombreux *mucus* recouvrant les cellules en contact avec le milieu extérieur.

oropharyngé. Cela peut entraîner des difficultés de mastication et de déglutition et peut influencer la qualité et/ou la quantité des apports alimentaires (Piaton et al., 2021).

Des recherches antérieures ont montré qu'un débit salivaire réduit et/ou une sécheresse buccale subjective étaient associés à un évitement de la nourriture et à une faible évaluation nutritionnelle. Il a été démontré que l'utilisation d'un substitut salivaire contenant du *mucus*, trois fois par jour, avant les repas traite la xérostomie et les troubles de la muqueuse buccale chez les personnes âgées (Piaton et al., 2021). Il apparaît donc nécessaire de développer de nouveaux substituts salivaires permettant d'améliorer les propriétés rhéologiques du bol alimentaire et la lubrification de la muqueuse laryngée qui soient les plus naturels possibles. Les arômes (parmi les plus courants : la menthe, le pamplemousse, le citron, *etc.*) devant être exclus de leur composition afin d'en faciliter l'acceptabilité au cours des repas.

3.1.4. Les mucilages

Les mucilages sont des hydrocolloïdes, composés de polysaccharides, très visqueux dérivés de graines de plantes ou de tiges tendres telles que le psyllium (*plantagospecies*), la moutarde jaune (*Sinapis alba*) ou le lin (*Linum usitatissimum*) (Azarpazhooh, Rashidi, Sharayei, Behmadi & Ramaswamy, 2021). Le mucilage de la graine de lin est composé d'hétéropolysaccharides hydrosolubles de poids moléculaire élevé représentant environ 3 à 9 % de la graine totale (Kaur, Kaur & Punia, 2018) ; il contient 50 à 80 % de glucides, 4 à 20 % de protéines et 3 à 9 % de matière sèche (Kaewmanee et al., 2014). En raison de leurs fonctionnalités technologiques (viscosité, gélification, pouvoir de rétention en eau similaire à celui de la gomme de guar (Fedeniuk & Biliaderis, 1994), liaison à l'eau) et de leurs fonctions physiologiques potentielles dans le tractus gastro-intestinal telles que la réduction du cholestérol sérique, la diminution de la réponse glycémique et insulinémique, l'utilisation de mucilage dans de nombreux produits alimentaires est en expansion (Cui, 2005 ; Wang, Wang, Li, Özkan, Chen & Mao, 2008).

Les graines de lin sont considérées comme un ingrédient fonctionnel d'importance, en raison de leur teneur élevée en acide linolénique, en fibres alimentaires, en lignanes[23], en flavonoïdes, en acides phénoliques et en protéines (Berglund, 2002). La graine de lin est un aliment et une fibre cultivés dans de nombreux pays du monde, le Canada étant le plus gros producteur (Kaur, Kaur & Gill, 2017). La

[23] Les lignanes sont des polyphénols s'accumulant dans les tissus ligneux, les graines et les racines de nombreuses plantes (Lamblin, Hano, Fliniaux, Mesnard, Fliniaux, & Laine, 2008).

graine de lin est riche en fibres alimentaires totales (20-28 %) et une consommation accrue de fibres alimentaires est associée à un risque plus faible de développer certains types de cancers (Grigor, Brennan, Hutchings & Rowlands, 2016). La grande majorité des glucides de la graine de lin est indigeste et se compose de fibres solubles et insolubles. La cellulose et la lignine constituent la fraction principale de ces fibres insolubles, tandis que les fibres solubles sont principalement constituées de mucilage (Mazza & Biliaderis, 1989). Le mucilage de la graine de lin se compose d'une fraction acide (17 %) comprenant un mélange de *L*-rhamnose, *L*-fucose, *L*-galactose et d'acide *D*-galacturonique et d'une fraction neutre (83 %) composée de *L*-arabinose, *D*-xylose et *D*-galactose (Kaur et al., 2018). Les graines de lin sont devenues l'une des principales sources d'ingrédients bioactifs dans le domaine des aliments fonctionnels. Leur consommation sous forme de mucilage s'avère bénéfique pour la gestion du diabète et des maladies cardiovasculaires, pour la prévention du cancer du côlon et la réduction de l'incidence de l'obésité (Singer, Taha, Mohamed, Gibriel & El-Nawawy, 2011).

Le mucilage est facilement extrait par trempage des graines de lin entières ou de leur farine dans l'eau (**Figure 3.4**). Ziolkovska (2012) a examiné l'effet de différents paramètres technologiques sur le rendement du mucilage de lin. Le rendement, les caractéristiques de composition et les propriétés rhéologiques du mucilage extrait dépendent du rapport graines/eau, du pH et du barème d'extraction temps/température utilisé (Mazza & Biliaderis, 1989). Le mucilage peut être lyophilisé, séché sous vide ou séché par pulvérisation pour produire une poudre de longue conservation.

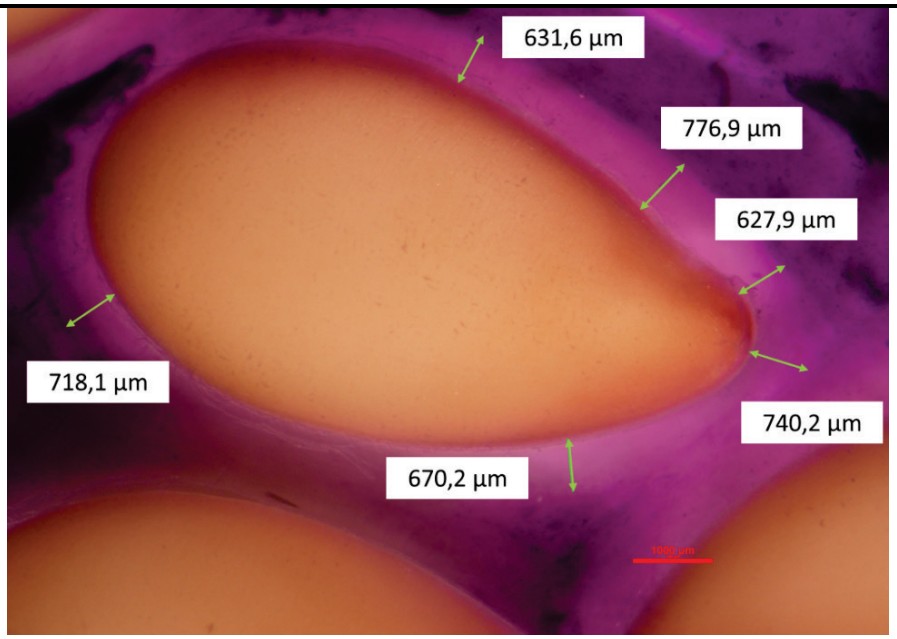


Figure 3.4. *Image de graines de lin doré en solution dans de l'eau à température ambiante. Le mucilage en cours d'extraction est visible, après coloration au bleu de toluidine. Son épaisseur autour de la graine a été mesurée au stéréomicroscope (image prise au laboratoire, non publiée).*

Plus la concentration en mucilage augmente, plus la viscosité augmente. Ceci est lié à la quantité de fibres apportées par le mucilage de graines de lin (Kaur et al., 2018). Des solutions de mucilage de graines de lin (concentration 1 %) ont été soumises à des tests rhéologiques de balayage en fréquence (0 à 100 Hz). Le module de perte G" était plus élevé que le module de stockage G' dans la région des basses fréquences (Kaur et al., 2018). Le croisement des courbes des modules G' et G" suggère un changement de conformation dans la molécule, et a été expliqué comme étant dû à la transition d'une structure en pelote aléatoire[24] vers une conformation enchevêtrée. À haute fréquence, le comportement devient plutôt élastique (G' > G") et, est typique de celui d'un fluide viscoélastique.

Le comportement d'écoulement de solutions aqueuses de mucilage en fonction du taux de cisaillement a été mesuré dans une plage allant de 1 à 100 s^{-1}, pour une gamme de concentration de 0,5 à 2 %. Il apparaît que la viscosité apparente (ou viscosité dynamique) diminue rapidement, puis se stabilise à mesure que le taux de cisaillement augmente. Toutes les solutions de mucilage ont présenté un comportement pseudoplastique ou d'amincissement par cisaillement, typique des systèmes polysaccharidiques (Azarpazhooh et al., 2021). Ce comportement d'amincissement par cisaillement et

[24] Une pelote aléatoire est une conformation d'un polymère dans laquelle les unités monomères sont orientées de façon aléatoire, en étant néanmoins liées aux unités adjacentes. Il ne s'agit pas d'une forme précise, mais d'une répartition statistique de formes pour toutes les chaînes dans une population de macromolécules.

les viscosités élevées des solutions de mucilage ont été attribués, en grande partie, aux polysaccharides neutres de masse moléculaire élevée (arabinoxylanes[25]) (Goh, Pinder, Hall & Hemar, 2006). Un comportement d'amincissement par cisaillement présente plusieurs avantages potentiels dans les applications alimentaires, notamment pour les procédés de pompage et de mélange (Inglett, Chen & Lee, 2013), y compris pour l'extrusion par I3D (Jiang et al., 2019 ; Xu et al., 2023).

Quelques applications utilisant les graines de lin ont déjà pu être développées. Elles ont notamment été intégrées dans des biscuits (Ganorkar & Jain, 2014), des muffins (Shearer & Davies, 2004), des barres alimentaires (Khouryieh & Aramouni, 2013), des pâtes extrudées (Sinha & Manthey, 2008 ; Vadukapuram, Hall, Tulbek & Niehaus, 2014) et des produits laitiers (ÖZer & Kirmaci, 2010). Des yaourts, des boissons lactées et des fromages contenant des extraits de lin ont été introduits sur le marché en tant que produits probiotiques (Korpela & Saxelin, 2005). Basiri, Haidary, Shekarforoush & Niakousari (2018) ont constaté que l'ajout de mucilage de graines de lin à un yaourt brassé en augmentait la viscosité et diminuait la synérèse[26]. L'ajout de mucilage a également diminué la cohésion et augmenté l'adhérence du yaourt brassé. Les attributs sensoriels ont été influencés par ces ajouts, cependant, le produit a pu être conservé de manière satisfaisante pendant 21 jours de stockage à 4°C. L'interaction des protéines et des fibres du mucilage avec, par exemple, du lait, aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel robuste et augmente la résistance du lait à l'écoulement (Ardabilchi Marand, Amjadi, Ardabilchi Marand, Roufegarinejad & Jafari, 2020). L'utilisation du mucilage de graines de lin, avec d'autres hydrocolloïdes (carraghénane) présente également l'avantage de réduire la synérèse.

3.1.5. Modélisation des conditions du processus d'impression et de leur relation avec les propriétés structurelles

La modélisation des conditions du procédé d'impression implique le couplage du transfert de chaleur avec la dynamique de l'écoulement (Tong, Zhao, Guo, Wang & Dong, 2023). Les modèles visent donc à résoudre numériquement les équations de conduction, de convection et celles de Navier-Stokes. La distribution de la vitesse et de la pression ainsi que leur impact sur le dépôt de la couche sont essentielles au cours du procédé d'impression et peuvent être prédits au moyen de ces simulations numériques. Le taux de cisaillement local peut également être important, car les produits

[25] Hémicellulose trouvée à la fois dans les parois cellulaires primaires et secondaires des plantes, y compris les bois et les céréales, consistant en des copolymères de deux sucres pentose-arabinose et xylose.
[26] Extraction ou expulsion d'un liquide à partir d'un gel souvent à la suite de la contraction de ce dernier.

imprimés ont tendance à présenter un comportement non-Newtonien. Les paramètres clés du procédé sont liés à l'extrusion à travers la buse de l'imprimante 3D : vitesse, température de la matrice et température de la buse, diamètre de la buse et pression appliquée. Une caractérisation préliminaire des propriétés thermiques et rhéologiques du matériau est nécessaire pour alimenter ces modèles. Ceux-ci fournissent à leur tour une relation entre ces propriétés et leur comportement pendant l'impression, qui peut ensuite être utilisée pour optimiser le contrôle de la précision géométrique et l'augmentation de la vitesse d'impression pour une qualité d'extrusion donnée. Ces objectifs sont généralement contradictoires, mais des réglages optimaux de la force/pression d'alimentation, de la température du matériau et du diamètre de la buse (Serdeczny, Comminal, Mollah, Pedersen & Spangenberg, 2020), et/ou de la trajectoire de contrôle (Comminal, Serdeczny, Pedersen & Spangenberg, 2019) peuvent les améliorer. Enfin, le procédé d'I3D étant une technologie à commande numérique, ces modèles peuvent également être utilisés dans une logique d'optimisation du pilotage de l'imprimante.

La microstructure qui en résulte est étudiée pour son impact sur les propriétés mécaniques et texturales de l'aliment (Jonkers, van Dommelen & Geers, 2020). Ces propriétés sont en partie dues au comportement thermique, à la pression, au cisaillement et aux contraintes résiduelles subies par le matériau en raison du processus d'impression (Oyinloye & Yoon, 2021) et, en partie aux réactions chimiques au sein du produit, telles que la glycation. En outre, la macrostructure, qui est la conséquence de l'alignement et de la liaison des filaments pendant l'impression et, son influence sur les propriétés mécaniques de l'ensemble du produit, peuvent également être une piste à explorer (Serdeczny, Comminal, Pedersen & Spangenberg, 2019).

3.1.6. Rhéologie appliquée aux aliments fonctionnels

3.1.6.1. Définitions

La rhéologie est une discipline qui traite de l'écoulement et des déformations des matériaux sous l'action de contraintes. Elle est utilisée pour décrire et expliquer les propriétés des matériaux au comportement mal défini et intermédiaire entre celui du solide élastique parfait et celui du fluide Newtonien, comme les matrices alimentaires (Couarraze & Grossiord, 2000).

Dans le **Chapitre 2**, la rhéologie a été utilisée pour comprendre l'effet de l'indice Bloom et de la teneur en eau initiale de gélatines sur le déroulement de la réaction de glycation. La rhéologie est également un outil de choix pour étudier les propriétés d'imprimabilité des aliments. Il est donc

nécessaire de définir les termes communément utilisés tout au long de ce chapitre. Les méthodes utilisées ici ont pour but de comparer des formulations de futurs aliments fonctionnels en fonction de leur composition et de leur température d'utilisation, mais aussi, afin de caractériser les outils développés pour les mettre en œuvre.

- ***Les propriétés d'écoulement (mesures rotationnelles) :***

Le comportement rhéologique d'un matériau est défini par une équation qui relie la contrainte de cisaillement τ (Pa), la viscosité η (Pa.s) et la déformation ɣ (%) ou la vitesse de déformation (= taux de cisaillement) $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) (Reeve & Amigoni, 2008 ; Springinsfeld, 2009) ; il s'agit de la loi de Newton :

$$\tau = \eta \times \dot{\gamma} \qquad \text{Eq. 3.1}$$

- La contrainte de cisaillement (*shear stress*) est définie pour un élément de surface *d*S parallèle aux plaques d'un rhéomètre par la relation :

$$\tau = \frac{dF}{dS} \qquad \text{Eq. 3.2}$$

Où *d*F est la force tangentielle exercée sur *d*S de la part de la couche voisine. C'est une grandeur équivalente à une pression, mais contrairement à la pression, il s'agit d'une contrainte tangentielle, associée au frottement des couches les unes sur les autres. C'est une grandeur dynamique, liée à la force par unité de surface responsable du mouvement.

- La déformation de cisaillement (*shear strain*) est une grandeur cinématique, descriptive du mouvement, qui est définie par :

$$\gamma = \frac{du(x,t)}{dx} \qquad \text{Eq. 3.3}$$

Où u(x,t) représente le déplacement parallèlement aux plaques d'une particule fluide à l'instant t ; x est l'axe perpendiculaire aux plaques. La grandeur ɣ représente donc le gradient de déplacement des particules fluides.

- Le taux de cisaillement (= vitesse de déformation) (*shear rate*) est la dérivée temporelle de la déformation de cisaillement :

$$\dot{\gamma} = \frac{\delta \gamma}{\delta t} = \frac{\delta v}{\delta x} \text{ où } v = \frac{\delta u(x,t)}{\delta t} \qquad \text{Eq. 3.4}$$

Où *v* est la vitesse de la particule fluide.

Il existe une relation entre la grandeur dynamique τ et la grandeur cinématique γ, dépendante de la nature du matériau, de la température, de la pression, *etc*. Dans certains cas, cette relation dépend également de l'histoire du matériau (effets de mémoire).

Les mesures par rotation permettent d'accéder aux propriétés d'écoulement d'échantillons assimilables à des liquides, en se basant sur la loi de Newton (Eq. 3.1). Pour un fluide Newtonien (fluide ne contenant pas de molécules complexes), la courbe de viscosité est une droite (Couarraze & Grossiord, 2000) (Fig. 3.5), signifiant que la viscosité n'est pas affectée par la variation du gradient de vitesse. Tous les liquides dont le comportement répond à cette caractéristique sont dits "Newtoniens". De nombreux autres liquides ne présentent pas ce comportement lors de l'écoulement, leur viscosité, dite "apparente", dépend du gradient de vitesse. Ils sont dits "non-Newtoniens" et peuvent se diviser en trois catégories : les fluides rhéofluidifiants, rhéoépaississants et plastiques (Guazzelli, 2001) :

- Un fluide rhéofluidifiant est caractérisé par une diminution de la viscosité, lorsque le gradient de vitesse augmente (Fig. 3.5). Sont concernés les émulsions, les suspensions, les dispersions et les polymères fondus. Ces matériaux présentent au repos une structure organisée qui provoque une résistance à l'écoulement. L'accélération de l'écoulement force les constituants des matériaux à s'orienter de façon parallèle entre eux. L'ensemble oppose ainsi une résistance moindre à l'écoulement, d'où une viscosité moins importante.
- La viscosité d'un matériau rhéoépaississant s'élève lorsque le gradient de vitesse augmente (Fig. 3.5). C'est le cas des suspensions aqueuses de concentration élevée. Au repos, chaque particule est entourée d'une mince couche de liquide. Lors du cisaillement, des zones "sèches" dues à l'insuffisance de phase continue apparaissent à la surface des particules et créent des forces de frottements, dont l'intensité augmente avec le cisaillement. Il en résulte une augmentation de la viscosité.

- Les matériaux plastiques présentent le comportement, soit d'un solide, soit d'un liquide, selon la contrainte de cisaillement qui est imposée. Ce sont des dispersions qui, au repos, forment un réseau de forces par des liaisons intermoléculaires et inter-particulaires (polaires ou de Van Der Waals). Ces forces limitent le changement de position des éléments du volume et donnent à la substance un comportement de solide ayant une viscosité infiniment élevée (**Figure 3.5**). Lorsque les forces extérieures appliquées surpassent les forces du réseau (forces structurelles internes), le dépassement du seuil de contrainte τ_0 (ou seuil d'écoulement) force les éléments du volume à changer irréversiblement de position. Il en résulte un effondrement du réseau qui correspond à la transition solide-liquide.

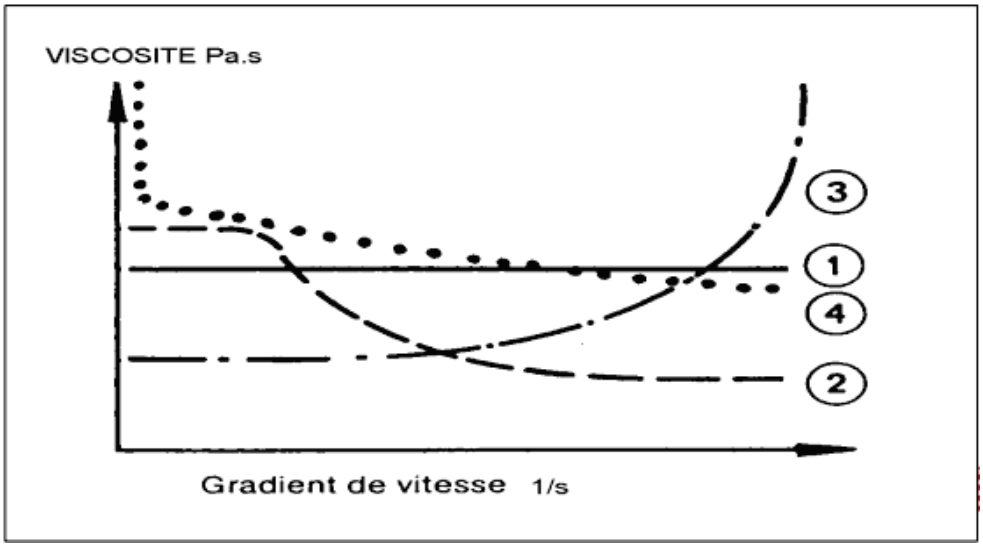


Figure 3.5. *Allures des courbes de viscosité pour différents types de fluides : 1) fluides Newtoniens ; 2) fluides non-Newtoniens rhéofluidifiants ; 3) fluides non-Newtoniens rhéoépaississants ; 4) fluides non-Newtoniens plastiques (D'après Schramm, 1981).*

- ***Les propriétés viscoélastiques (mesures oscillatoires) :***

Ces mesures permettent l'analyse des différentes composantes d'un produit : la part de viscosité (caractère liquide) et la part d'élasticité (caractère solide) dues à des interactions plus ou moins fortes et nombreuses entre les différents constituants présents. Elles permettent la mise en évidence du caractère intermédiaire viscoélastique de beaucoup de matrices alimentaires. Le rotor du rhéomètre ne tourne plus, mais oscille au sein du fluide. Il est possible de faire varier la fréquence et l'amplitude de ces oscillations (Reeve & Amigoni, 2008). Il s'agit d'une analyse dynamique qui consiste à imposer à l'échantillon une sollicitation sinusoïdale (déformation ou contrainte) de pulsation ω et de faible amplitude. La réponse du matériau, dans le régime linéaire, est alors une fonction sinusoïdale de

même pulsation présentant un certain déphasage δ (Springinsfeld, 2009).

Les mesures en mode oscillatoire, sous de faibles déformations et dans la zone de pseudo-linéarité viscoélastique, constituent un mode de caractérisation très répandu des aliments. Dans ces conditions, la structure de l'aliment n'est pas détériorée par la mesure. Pour de faibles déformations, la contrainte τ est proportionnelle à la déformation ɣ suivant la loi de Hooke :

$$\tau = G\,\gamma \qquad \text{Eq. 3.6}$$

Où G est le module de cisaillement.

Lors de tests oscillatoires, la géométrie du rhéomètre se déplace d'avant en arrière à une fréquence et à une amplitude constante. La déformation définie (ɣ) et la contrainte de cisaillement (τ) mesurée sont utilisées pour calculer le module de conservation G' (Pa) et le module de perte G'' (Pa). Le module G' est une valeur de l'énergie de déformation conservée dans le système et caractérise la partie élastique de l'échantillon (en phase avec la déformation). Cette valeur renseigne sur la propriété de déformation réversible. Le module G'' représente l'énergie de déformation perdue et décrit donc le caractère liquide ou visqueux de l'échantillon et renseigne sur le caractère de déformation irréversible (en déphasage avec la déformation). Le rapport entre la partie visqueuse et la partie élastique est appelé le facteur de perte ou d'amortissement (tan δ) (Nijdam, LeCorre-Bordes, Delvart & Schon, 2021).

$$tan\,\delta = \frac{G''}{G'} \qquad \text{Eq. 3.7}$$

Les tests oscillatoires habituellement utilisés sont des tests de balayage d'amplitude (ou de déformation), de balayage en fréquence et des tests en fonction du temps ou de la température. Si les valeurs du module G' mesurées dans les matériaux sont supérieures à celles du module G'' pour les gammes de fréquences explorées, les matériaux présentent un comportement de solide viscoélastique. Pour un solide idéal, il n'y a pas de composante visqueuse, G'' est nul et tan δ est également nulle. Pour un liquide idéal, tan δ tend vers l'infini. Le facteur de perte est un indicateur du niveau de structure du matériau :

- Si tan δ > 1, le matériau se comporte comme un liquide ;
- Si tan δ < 1, le matériau se comporte comme un solide.

- Balayage en amplitude ou en déformation

En général, les tests oscillatoires commencent par un balayage en amplitude ou en déformation (**Figure 3.6**). Normalement, la mesure d'un balayage en amplitude se caractérise par une augmentation logarithmique de la déformation ɣ de 0,01 à 100 ou 1000 % avec 5 points de mesure par dizaine et une fréquence angulaire (ω)[27] constante de 10 $rad.s^{-1}$. En repérant le point à partir duquel la structure commence à se rompre, il est possible de déterminer la Région Viscoélastique Linéaire (LVR) qui correspond à la courbe parallèle des modules G' et G'' le long de l'axe x. Cette courbe parallèle des modules G' et G'' signifie que la structure de l'échantillon n'est pas détruite par la déformation exercée. La LVR renseigne également sur la nature structurelle de l'échantillon. Dans la LVR, les contraintes appliquées sont insuffisantes pour provoquer une rupture structurale (fissure), ce qui permet d'en mesurer les propriétés micro-structurelles. Lorsque les contraintes appliquées dépassent la limite d'élasticité, des non-linéarités apparaissent et les mesures ne peuvent plus être corrélées avec les propriétés micro-structurelles. La limite de la LVR correspond au point où le module G' devient dépendant de la contrainte ou de la déformation. La déformation maximale (en %) du matériau avant déstructuration est alors déterminée à la fin de la LVR. D'un point de vue pratique, la fin de la LVR est déterminée par la baisse de la valeur de G', comprise entre 3 et 10 %, par rapport à la zone linéaire.

Comme indiqué *supra*, si le module G' domine le module G'', l'échantillon a le comportement d'un solide viscoélastique ; si c'est l'inverse, l'échantillon se comporte comme un fluide viscoélastique. Etant donné que le module de conservation G' quantifie l'énergie de déformation conservée, il reflète aussi la résistance structurelle de l'échantillon. A déformation croissante, les modules G' et G'' commencent à dévier de leur courbe parallèle en un point précis appelé seuil d'écoulement (**Figure 3.7**). Ce seuil indique la déstructuration du matériau, résultat de l'augmentation des forces externes par rapport aux forces structurelles internes de l'échantillon. En général, G' et G'' commencent tous deux à décroitre à partir de ce point. Après celui-ci, le module de conservation cesse de dominer le module de perte, l'échantillon passe de l'état gélifié à l'état liquide et commence à couler. La pente de la courbe après la LVR (**Figure 3.6**) traduit la cohésion de l'échantillon, une pente élevée étant le signe d'une déstructuration plus rapide.

[27] La vitesse/fréquence angulaire (ω exprimée en $rad.s^{-1}$) ou vitesse de rotation est une grandeur physique qui représente le taux de variation d'un angle par rapport au temps. C'est l'analogue de la vitesse de translation pour un mouvement de rotation.

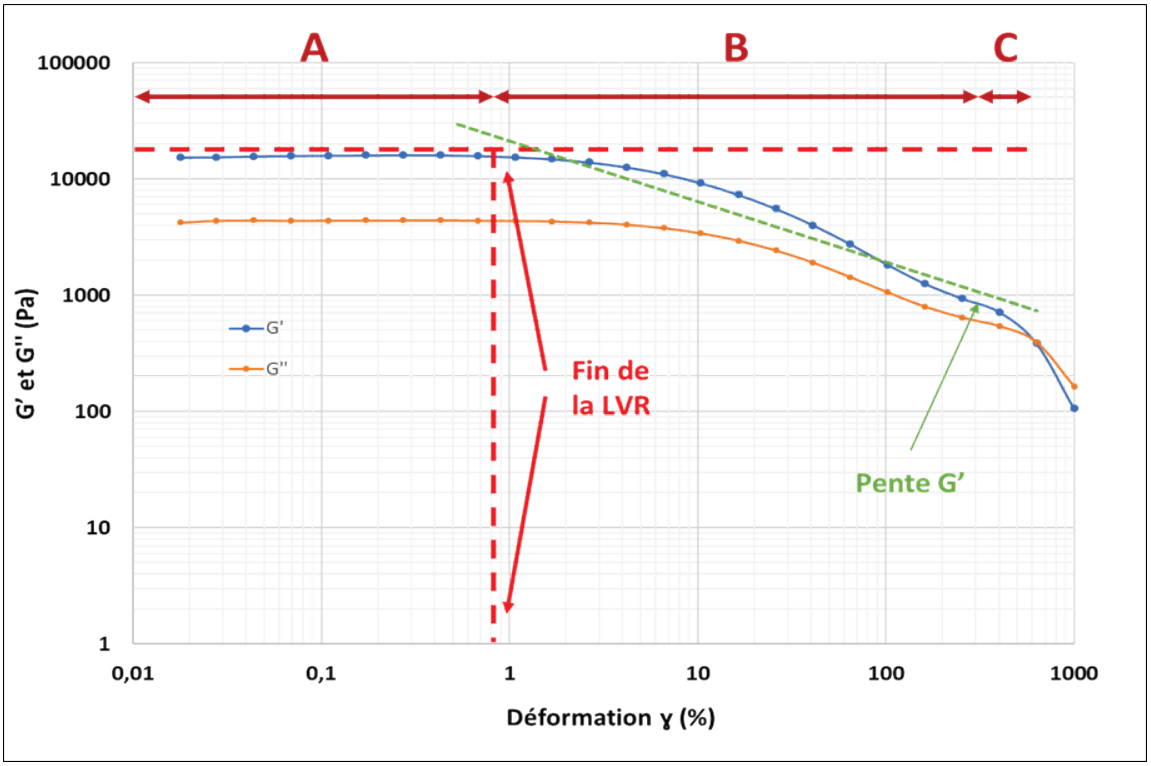


Figure 3.6. *Représentation graphique de la Région Viscoélastique linéaire, d'un échantillon de viande de bœuf broyé et tamisé (à 30 °C), calculée à partir de courbes expérimentales de balayage en déformation. La déformation ɣ est ici exprimée en % sur une échelle logarithmique. Zone A – La déformation appliquée n'a pas d'effet sur la microstructure de l'échantillon ; Zone B – La déformation est réversible ; Zone C – La déformation est irréversible, l'échantillon s'écoule.*

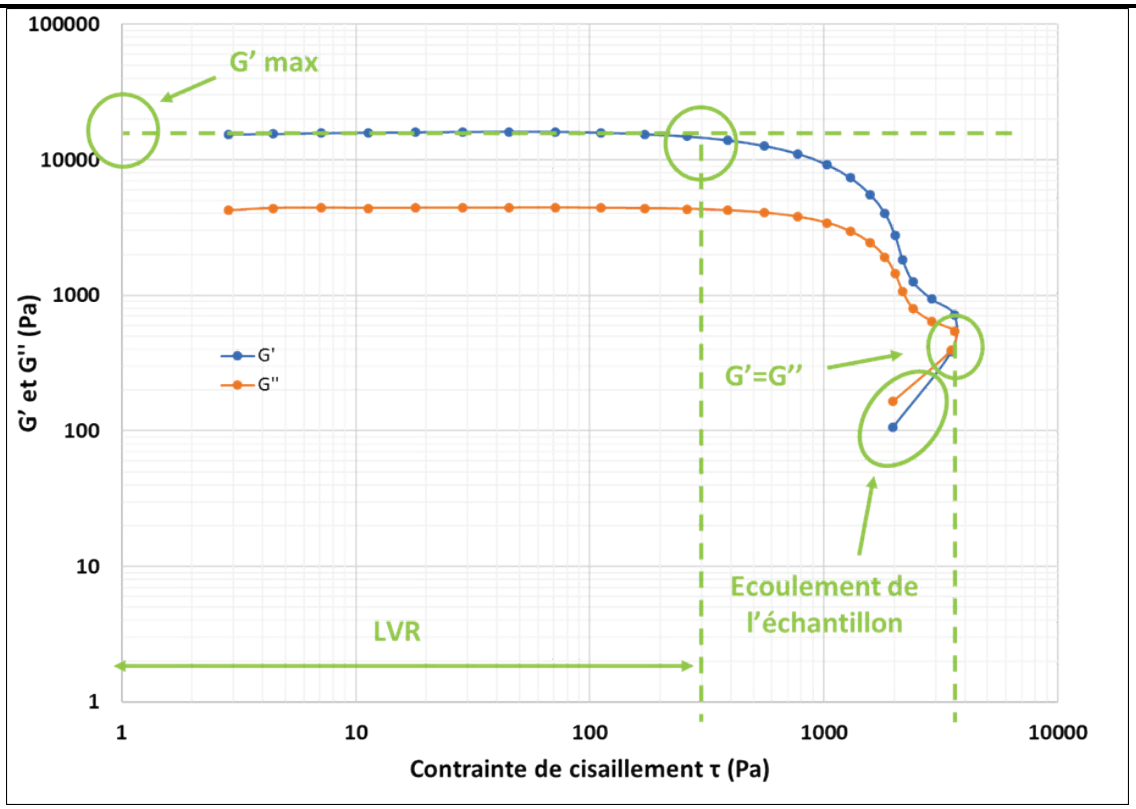


Figure 3.7. *Représentation graphique des paramètres rhéologiques, déterminés en régime oscillatoire, sur de la viande de bœuf broyée et tamisée (à 30 °C).*

- Balayage en fréquence

Les balayages en fréquence sont utilisés pour observer le comportement à long et court terme d'un échantillon lors d'une même mesure. Le comportement à long terme est représenté par les résultats à basses fréquences tandis que les résultats à hautes fréquences montrent le comportement à court terme. Connaissant les limites de la LVR de l'échantillon, il est possible de sélectionner une déformation dans cette plage du balayage en amplitude et une fréquence angulaire décroissante de manière logarithmique. Comme avec le balayage en amplitude, la forme de la courbe et le rapport des modules G' et G'' donnent des informations plus détaillées sur la structure de l'échantillon : si G' > G'', alors le matériau est structuré ; si G' < G'', le matériau se comporte comme un fluide ; dans la zone intermédiaire, le matériau a un comportement viscoélastique.

Lors de la mesure des caractéristiques viscoélastiques, il est important que celles-ci soient réalisées dans la LVR, où la contrainte et la déformation sont proportionnelles. Dans la LVR, le module de cisaillement complexe G* (Pa) s'écrit comme la somme d'une composante réelle, le module de conservation (G') et d'une composante imaginaire, le module de perte (G'').

La viscosité complexe, η* (Pa.s), correspond à la viscosité mesurée en régime sinusoïdal aux

petites déformations pour lesquelles le produit n'est pas déstructuré. Elle est calculée à partir du modèle de Cox-Merz (Bair et al., 2014) lors d'un balayage en fréquence dans la LVR (Eq. 3.8). Si les valeurs du module G' sont supérieures à celles du module G'' sur l'ensemble de la gamme de fréquence classiquement étudiée dans la littérature (de 0,1 à 10 Hz ou 0,6 à 62,8 rad.s^{-1}), cela traduit les propriétés très élastiques d'un liquide, pour lequel l'énergie conservée est supérieure à l'énergie dissipée (tan δ <1) (Masbernat, 2021).

$$\eta * = \left[\left(\frac{G''}{\omega}\right)^2 + \left(\frac{G'}{\omega}\right)^2\right]^{1/2} \qquad \text{Eq. 3.8}$$

Avec η* la viscosité complexe (Pa.s), G' le module de conservation (Pa), G'' le module de perte (Pa) et ω la fréquence angulaire (rad.s^{-1}).

Une expérience en fréquence avec une amplitude de signal fixée et choisie dans la LVR rend compte de la force et du nombre des interactions entre les différents constituants. Des temps de relaxation (fréquences pour lesquelles G' = G'') sont déterminés et correspondent au temps que met chaque interaction à se régénérer après la perturbation oscillatoire. Plus ce temps est court, plus l'interaction est forte et le caractère élastique marqué. Si, au début de l'expérience, G' > G'', on parle alors de solide viscoélastique ou solide de Voigt. Inversement, si G'' > G', on a alors affaire à un liquide dit liquide viscoélastique de Maxwell.

Pour un fluide avec un comportement rhéofluidifiant, la diminution de la viscosité, lorsque le taux de cisaillement augmente, traduit un phénomène d'amincissement par cisaillement (mélasse, ketchup, crème fouettée, *etc*.). En d'autres termes, le mouvement du fluide est difficile initialement à des vitesses de déformation lentes, mais celui-ci s'écoulera plus librement à des vitesses élevées. Un exemple concret est celui du ketchup, où le fait de secouer la bouteille permet d'en diminuer la viscosité et facilite son écoulement. Ce phénomène a été constaté par Etxabide, Akbarinejad et al. (2022) dans le cas de solutions de gélatine. La diminution de la viscosité à la température de gélification peut être liée au désenchevêtrement des chaînes de polymères, aux interactions protéine-protéine et protéine-solvant avec l'augmentation du taux de cisaillement. L'augmentation de la viscosité à la température de fusion du gel peut, quant à elle, être liée à l'étirement et à l'alignement des chaînes de polymères, qui conduisent à la formation de forces intermoléculaires. Ces constatations ont été réalisées pour une déformation $\dot{\gamma}$ = 6,39 s^{-1}. La diminution de la viscosité peut être la résultante

de modifications de la température ou de l'augmentation du taux de cisaillement dû à l'ajout d'ingrédients dans une formulation (Xu et al., 2023). D'autres auteurs ont également observé qu'un comportement d'amincissement était un critère positif pour l'extrusion au travers d'une buse d'I3D d'une pâte constituée de viande de porc (Dong et al., 2023 ; Xu et al., 2023). Selon Guazzelli (2001), il peut se produire un phénomène de gonflement à l'extrusion en sortie d'un tube ou d'une buse, si le fluide est non-Newtonien (**Figure 3.8**). A la sortie de l'orifice du tube, la tension le long des lignes de courant du fluide se relâche en se contractant dans la direction longitudinale, ce qui résulte en une expansion latérale du liquide à cause de son incompressibilité. C'est notamment le cas pour les suspensions d'amidon de maïs.

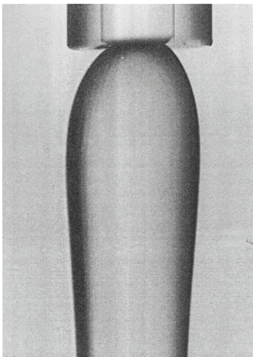


Figure 3.8. *Illustration du phénomène de gonflement à l'extrusion pour une solution aqueuse de polyacrylamide (2 %) (D'après Guazzelli, 2001).*

3.1.6.2. Applications de la rhéologie aux aliments fonctionnels imprimés en 3D

La viande peut être définie comme un système colloïdal polyphasé présentant une rhéologie complexe, i.e. avec un comportement plastique ou pseudoplastique (amincissement par cisaillement). Cette structure complexe est le résultat d'interactions entre les particules de la phase dispersée et d'autres molécules colloïdales ajoutées pour contrôler les propriétés du système, comme l'ajout de gélatine pour améliorer les propriétés rhéologiques et la capacité de gélification (Dong et al., 2023). Toujours selon ces auteurs, la viande possède une imprimabilité médiocre, qui doit être améliorée par un procédé ou par l'ajout d'ingrédients (gélatine, mucilage, etc.). Comme indiqué supra avec le comportement d'amincissement, il est possible de transposer les grandeurs rhéologiques aux caractéristiques d'extrusion des aliments. Ces propriétés d'extrusion sont caractérisées par la viscosité et le module de perte G'', grandeur caractérisant la dissipation de l'énergie par le matériau soumis à une déformation. Les propriétés de la rétention de la forme du filament et de la stabilité de l'empilement des couches (écrasement/affaissement) sont, quant à elles, données par le module de

conservation G' et par la contrainte seuil (Jiang et al., 2019 ; Yang et al., 2018). A noter que le module G' peut être un indicateur pertinent pour prédire la forme du filament et de l'objet imprimé (Lille et al., 2018 ; Liu et al., 2018 ; Zhang, Lou & Schutyser, 2018). La rétention de forme est positivement corrélée au module G' jusqu'à atteindre une valeur pour laquelle l'extrusion et/ou la qualité d'impression globale diminue. La contrainte seuil est la plus faible contrainte de cisaillement au-dessus de laquelle le matériau s'écoule et en-dessous de laquelle le matériau présente les propriétés d'un solide. Cette contrainte est la force minimale nécessaire pour rompre la structure du produit et provoquer son écoulement (**Figure 3.9**).

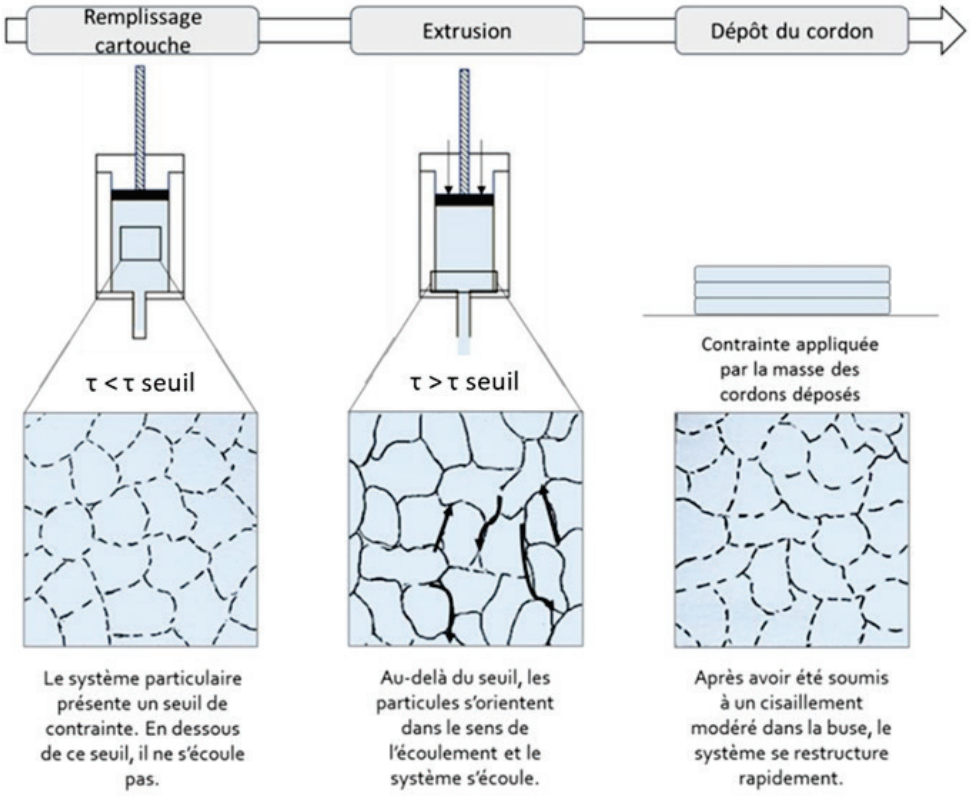


Figure 3.9. *Représentation schématique de l'impression 3D de systèmes particulaires concentrés en particules molles. Les flèches noires représentent le glissement des particules les unes sur les autres et sur la paroi de la buse (D'après (Masbernat, 2021).*

La mesure de la viscosité sous une vitesse de cisaillement croissante est intéressante pour comprendre le comportement d'écoulement du matériau lors de l'extrusion. Au repos, le module visqueux G'' doit être suffisamment élevé pour limiter l'écoulement du matériau soit avant l'impression, soit après rétraction du matériau pour le déplacement de la tête d'impression sans dépôt de matière (Masbernat, 2021).

3.2. Matériels et méthodes

Le **Tableau 3.2** synthétise l'ensemble des matériels et logiciels utilisés pour la partie expérimentale du Chapitre 3.

Tableau 3.2. *Matériels utilisés pour la préparation et l'analyse des matrices alimentaires.*

Matériels	Fournisseurs
Balance de précision DeltaRange AG204	Mettler Toledo, France
pH-mètre MA235, sonde Inlab 427	Mettler Toledo, France
Balance Explorer Pro	Ohaus, Suisse
Agitateurs magnétiques Ikamag RH	Janke & Kunkel Ika labortechnik, Allemagne
Agitateur mécanique RZR 2021	Heidolph, Allemagne
Bain à ultra-sons GT SONIC-D6	GT Sonic, Chine
Purificateur d'eau Direct-Q3	Millipore, France
Four de dessication ED240 +300 °C	Binder GmbH, Allemagne
Broyeur à billes	Conçu dans l'unité QuaPA
Etuve thermostatée BD115 +100°C	Binder GmbH, Allemagne
Texturomètre EZ-Test LX	Shimadzu, France
Logiciel TrapeziumX V1.5.5	Shimadzu, France
Capteur de force 100N ± 1%	Shimadzu, France
Rhéomètre HAAKE MARS iQ Air	Thermo Electron GmbH, Allemagne
Logiciel RheoWin Job Manager V4.87.0018	Thermo Electron GmbH, Allemagne
Logiciel RheoWin Data Manager V4.87.0018	Thermo Electron GmbH, Allemagne
Stéréomicroscope MZ6	Leica Biosystems, Allemagne
NIS-Elements D 5.30.03	Nikon Instruments INC, USA
Statistica 14.0.015	Tibco Software Inc., USA

3.2.1. Conception d'un prototype de simulation d'extrusion

Afin de déterminer le comportement rhéologique des matrices destinées à être imprimées en 3D, un prototype de simulation d'extrusion a été conçu et fabriqué au laboratoire. Celui-ci mime la géométrie du système d'extrusion de l'imprimante 3D décrite au **Chapitre 1** et peut être adapté sur le texturomètre EZ-Test LX, afin de mesurer les forces mises en œuvre, tout en contrôlant la vitesse de déplacement du piston.

3.2.1.1. Corps de l'extrudeur

Comme décrit dans le **Chapitre 1**, le corps de l'extrudeur se présente sous la forme d'une seringue, les modèles utilisés en tant que réservoir sur l'imprimante 3D sont en plastique. Afin de s'affranchir d'éventuelles déformations pendant la phase d'extrusion et de limiter les biais de mesures, il a été décidé de reproduire la géométrie de ces seringues en acier inoxydable 316L. Cette nouvelle seringue métallique a été modélisée par CAO (*Inventor* 3D®), puis imprimée en 3D, à l'aide du procédé *Desktop Metal™* (*cf*. **Chapitre 1**, section 1.2.5.2) (**Figure 3.10**).

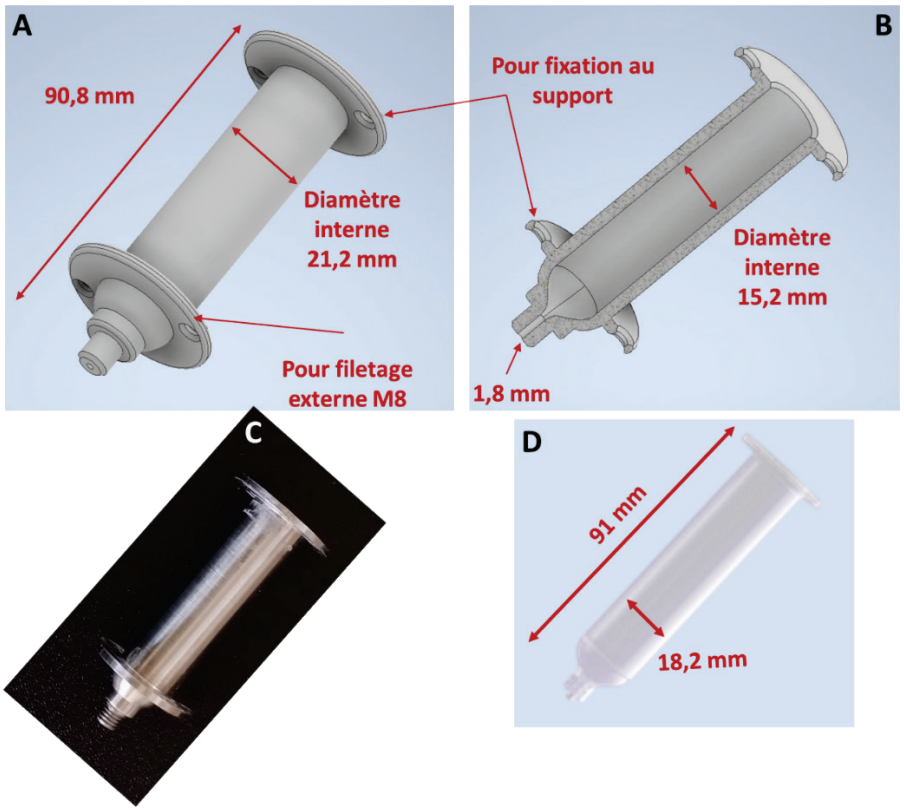


Figure 3.10. *Prototype de seringue en acier inoxydable 316L développé au laboratoire. A – Vue entière de la modélisation CAO de la seringue ; B – Vue en coupe de la modélisation CAO ; C – Seringue après impression et reprise d'usinage ; D – Seringue plastique utilisée dans l'imprimante 3D alimentaire.*

Après le procédé d'I3D, la pièce a subi un ébavurage par tribofinition, puis une reprise d'usinage au tour conventionnel. Le diamètre interne avait été volontairement réduit de 0,5 mm lors de la CAO, afin de permettre un ajustage avec le piston. L'alésage réalisé était de 15,3 mm. Le piston utilisé correspondait au même modèle que celui utilisé dans l'imprimante 3D alimentaire (**Figure 3.11**). Ce piston possède une partie métallique qui permet un contact plan avec l'outil du texturomètre et une

lèvre en PTFE[28] qui assure l'étanchéité avec le corps de la seringue. La surface du piston sur laquelle s'applique la force est de 1,9607.10^{-4} m^2.

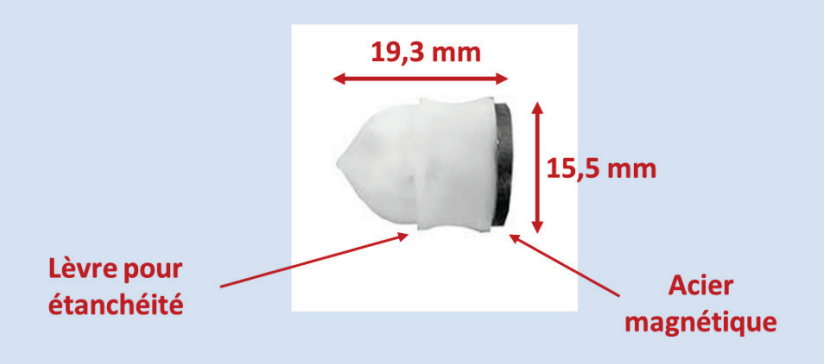


Figure 3.11. *Photographie d'un piston en PTFE et acier. Modèle propriétaire, utilisable dans le doseur volumétrique Precifluid®.*

3.2.1.2. Buse d'extrusion

La buse utilisée pour les expérimentations du présent chapitre est identique à celle présentée au **Chapitre 1** (*cf*. 1.3.2.1.2), tout du moins au niveau des cotes internes. Les cotes externes ont été ajustées afin de corriger les problèmes de colinéarité présentés dans cette section. La **Figure 3.12** correspondant à une modification de la **Figure 1.17** (**Chapitre 1**) montre la différence entre les deux buses modélisées. Outre une multiplication par 4 de l'épaisseur des parois, le pas de vis a été supprimé afin que la buse puisse être soudée dans un raccord, lui-même disposant d'un pas de vis métrique (M8) permettant une adaptation sur la seringue (**Figure 3.13** et **Figure 3.14**). De plus, des ailettes ont été ajoutées en partie haute de la buse pour faciliter le vissage de l'ensemble buse/raccord sur la seringue. Précisons que les modifications opérées ne changent en rien le trajet parcouru par la matrice alimentaire lors de l'extrusion.

[28] Tétrafluoroéthylène (Téflon®).

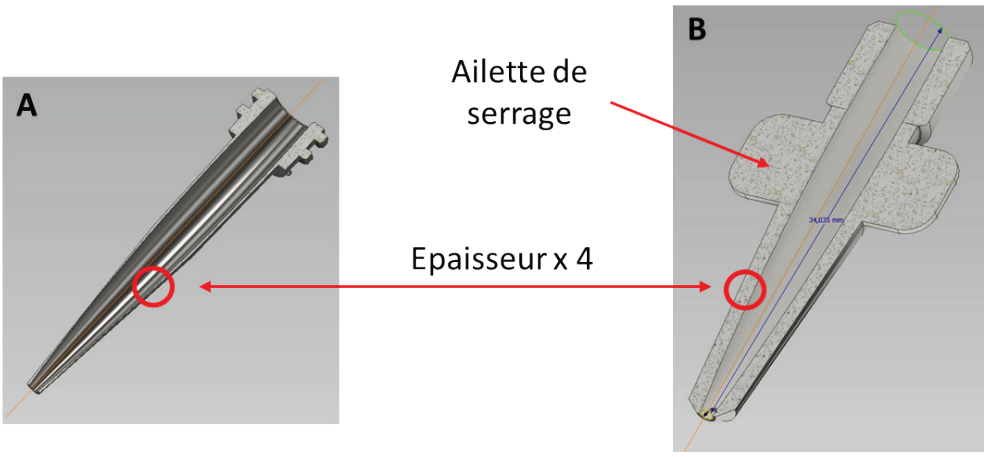


Figure 3.12. *Vue en coupe d'une : A – buse d'extrusion, dont la paroi a une épaisseur de 0,25 mm ; et B – buse d'extrusion dont la paroi a été renforcée à 1 mm d'épaisseur, de façon à éviter toute déformation lors de l'impression 3D métal.*

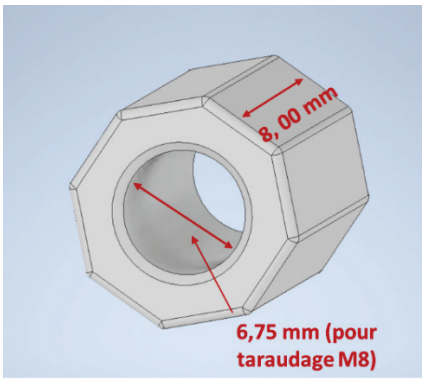


Figure 3.13. *Raccord modélisé pour l'assemblage de la buse et de la seringue.*

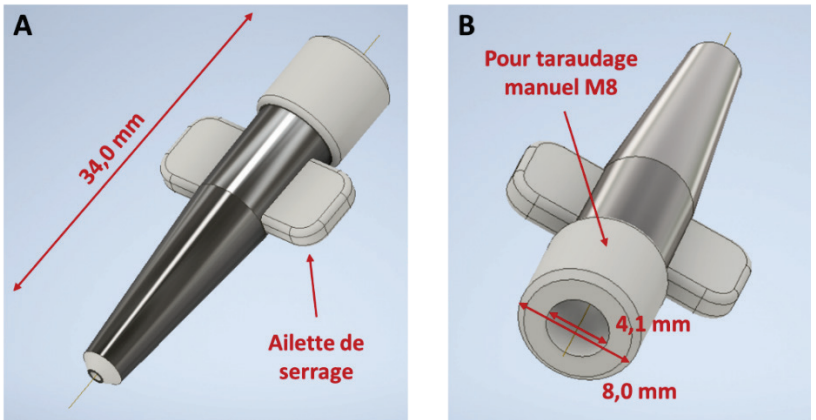


Figure 3.14. *Vue entière de la nouvelle buse d'extrusion. A – Vue avant (orifice d'extrusion) ; B – Vue arrière (connexion à la seringue).*

Comme indiqué au **Chapitre 1** (*cf.* 1.3.2.1.2), l'impression métallique des buses épaissies provoque un rétrécissement de leurs orifices. Une reprise d'usinage a donc été nécessaire pour obtenir le même diamètre que sur l'imprimante 3D (*i.e.* 0,97 mm ± 0,01 mm) (**Figure 3.15**).

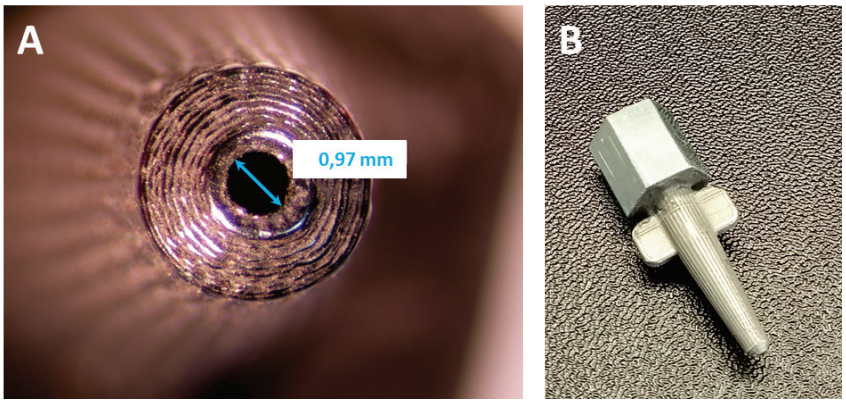


Figure 3.15. *Buse d'extrusion imprimée en 3D métal et destinée au simulateur d'extrusion. A - Diamètre de l'extrémité de la buse après reprise d'usinage et mesuré au stéréo-microscope ; B – Buse soudée dans le raccord à vis.*

3.2.1.3. Adaptation du dispositif sur le texturomètre

La construction d'un bâti métallique a été nécessaire pour adapter l'ensemble seringue/buse sur la plate-forme du texturomètre (**Figure 3.16**).

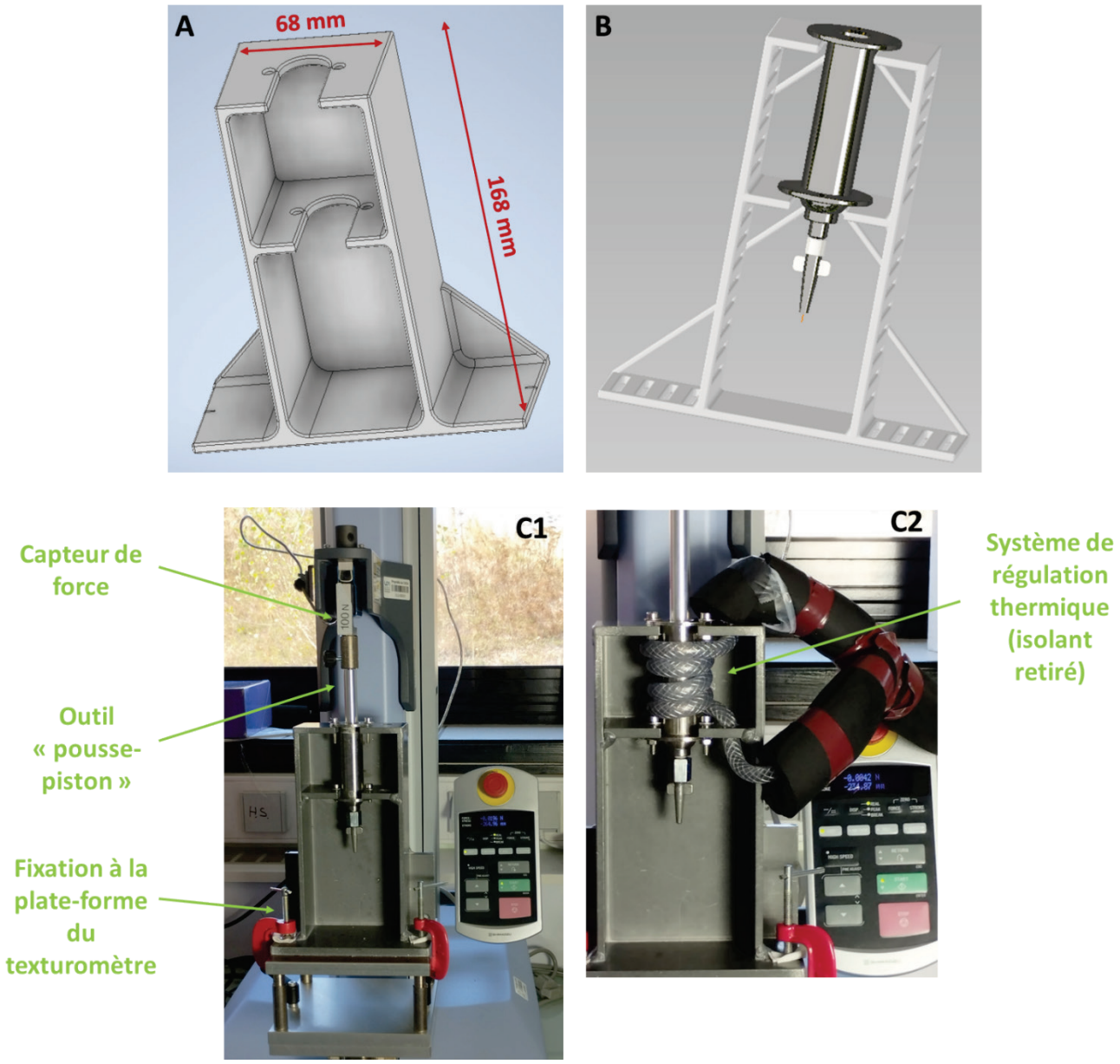


Figure 3.16. *Représentations schématiques et photographies du bâti qu'il a été nécessaire de concevoir afin de permettre le positionnement de la seringue et de la buse d'extrusion sur le texturomètre. A – Modélisation CAO du bâti ; B – Assemblage CAO (le raccord (**Figure 3.13**) n'est pas positionné pour plus de lisibilité) ; C1 et C2 – Photographies après installation sur le texturomètre.*

3.2.1.4. Détermination des conditions d'extrusion

Afin de se placer dans les mêmes conditions d'extrusion que l'imprimante 3D, les vitesses de déplacement du doseur volumétrique de précision Precifluid® ont été mesurées, par mesure de la longueur de déplacement de la vis (au pied à coulisse, ±0,02 mm), et ce, pour 3 débits de matière utilisés fréquemment lors des impressions (**Tableau 3.3**).

Tableau 3.3. *Vitesses de déplacement du Precifluid mesurées, puis transposées sur le texturomètre.*

Débit fixé sur le Precifluid® (%)	Déplacement (mm)	Temps (s)	Vitesse de déplacement ($mm.min^{-1}$)
300	1,60	77	1,25
400	2,20	82	1,61
500	2,60	75	2,08

Ces vitesses ont pu être programmées dans un fichier de méthode intégré au logiciel *TrapeziumX* pilotant le texturomètre, qui se déroulait de la façon suivante :

- Remplissage de la seringue avec l'échantillon (en excès) ;
- Placement du piston (**Figure 3.16**) et appui manuel jusqu'à l'alignement de la partie métallique du piston avec le haut de la seringue (purge) ;
- Descente de l'outil à proximité du piston de la seringue ;
- Mise à 0 de la force mesurée par le capteur et de la position de l'outil ;
- Lancement de la méthode (**Figure 3.17**) : (i) Descente à 50 $mm.min^{-1}$ jusqu'à une valeur de force de 0,2 N (détection du piston) ; (ii) Maintien pendant 5 s ; (iii) Descente de l'outil à la vitesse programmée (1,25 ; 1,61 ou 2,08 $mm.min^{-1}$), avec enregistrement de la force appliquée sur le piston et sa position ; (iv) Effectuer 3 cycles de descente de 10 mm (3 répétions d'extrusion) ; et (v) Lancer la procédure « Purge complète », qui permet de vider la totalité de la seringue à la même vitesse (recueil de l'échantillon pour les mesures de rhéologie post-extrusion).

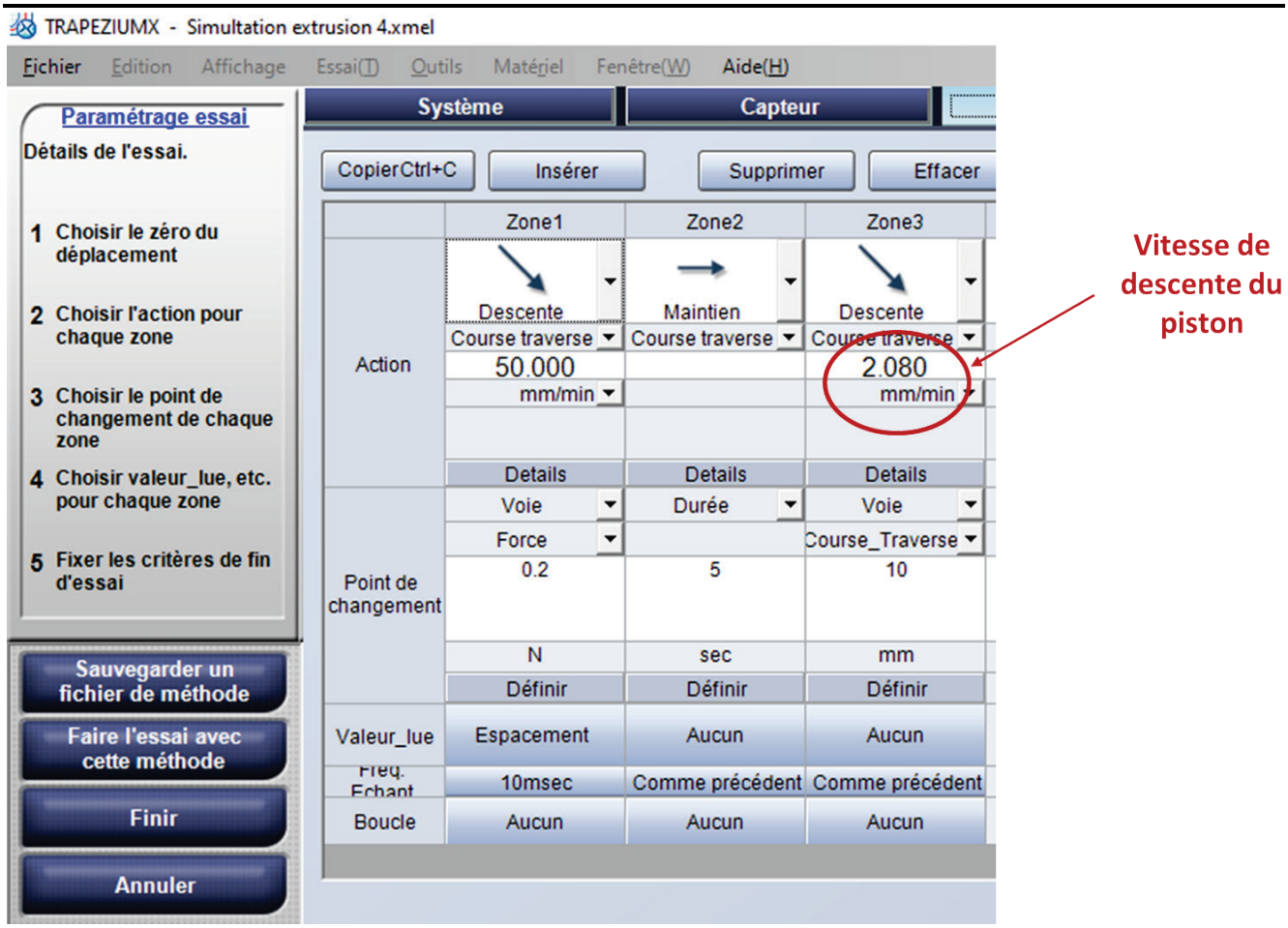


Figure 3.17. *Capture d'écran du logiciel TrapeziumX (texturomètre). Exemple d'un fichier de méthode programmant la descente du piston à une vitesse de 2,08 mm.min^{-1}.*

3.2.2. Préparation des ingrédients

Le **Tableau 3.4** indique les données physico-chimiques des matières premières utilisées.

Tableau 3.4. *Valeurs de teneur en eau, d'activité de l'eau (a_w) et de pH des matières premières utilisées et servant de base au futur aliment fonctionnel.*

Echantillons	Teneur en eau (k_{eau}/kg_{MS})	a_w	pH
Viande	3,13	0,985	5,523
Farine	0,07	/	/
Mucilage extrait à froid	384,67	0,986	5,951
Mucilage extrait à chaud	114,13	0,988	6,145
Gélatine (300 Bloom à 25 %)	3,40	0,988	5,49

3.2.2.1. La viande

Deux muscles *Semitendinosus* (rond de gîte contenant 23 % de protéines et 2 % de lipides (ANSES, 2017), issus de bœuf de race Charolaise, ont été achetés dans une boucherie. Les muscles ont

été congelés, puis découpés en cubes de 15 mm de côté (les trames de tissu conjonctif ont été retirées), avant d'être broyés finement au moyen d'un broyeur à billes après refroidissement à l'azote liquide (**Annexe S 3.3**). La poudre obtenue a été répartie en sachets de 100 g, avant d'être conservée sous vide à – 18 °C. Avant chaque expérimentation, la poudre de bœuf était décongelée au réfrigérateur, à 4 °C, puis tamisée sur une grille de maillage 1 x 1 mm.

3.2.2.2. Le mucilage

Le mucilage utilisé est extrait de graines de lin doré (*Linum flavum L.*) cultivées en France, en agriculture biologique (Biocoop, France). Leur composition est donnée dans le **Tableau 3.5**.

Tableau 3.5. *Composition et valeur nutritionnelle des graines de lin doré utilisées pour l'extraction du mucilage, ainsi que celles de la farine de lupin ajoutée aux préparations.*

Valeurs nutritionnelles moyennes	Pour 100 g de graines de lin	Pour 100 g de farine de lupin
Energie	2090 kJ/ 506 kcal	1399 kJ/ 335 kcal
Matières grasses	37,0 g	7,0 g
(dont acides gras saturés)	3,2 g	2,0 g
Glucides	6,6 g	13,0 g
(dont sucres)	1,6 g	3,0 g
Fibres alimentaires	27,0 g	32,0 g
Protéines	24,0 g	39,0 g
Sel	<0,06 g	0,01 g

Deux modes d'extraction ont été utilisés : une extraction à froid (mode opératoire en **Annexe S 3.1**), couplée ou non à une étape de sonication ; et une extraction à chaud (mode opératoire en **Annexe S 3.2**). Ces 2 modes d'extraction permettent d'obtenir des consistances de mucilage très différentes : obtention d'une solution fluide, proche de la salive humaine, à la suite de l'extraction à froid ; et obtention d'une consistance plus gélifiée, proche du blanc d'œuf, suite à l'extraction à chaud. De plus, la sonication pouvant permettre d'optimiser l'extraction à froid (Fabre, Lacroux, Valentin & Mouloungui, 2015), l'effet de cette méthode a été évaluée pour des temps de 30 et 60 min.

3.2.2.3. Les différentes formulations

Différentes formulations ont été préparées afin d'en mesurer les propriétés rhéologiques :

- A base de viande de bœuf pure, considérée comme notre témoin ;
- A base de viande de bœuf salée à 1,5 % pour évaluer l'impact du sel ;

- A base de viande de bœuf, plus 1 % de farine de lupin (issue de l'agriculture biologique, Markal, France, **Tableau 3.5**). L'ajout de farine n'a pas vocation à modifier les propriétés d'écoulement de la viande, mais à lui donner un meilleur aspect visuel lors du post-traitement. D'ailleurs, la farine de lupin possède des propriétés gélifiantes et épaississantes relativement faibles, par exemple, par rapport au soja (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003). L'influence de la farine a néanmoins été évaluée ;
- A base de viande de bœuf, plus 6 ou 18 % de gélatine. Comme indiqué dans le **Chapitre 0**, la gélatine a une influence positive sur la sensation en bouche de l'aliment, notamment en cas de problèmes de mastication ou de dysphagie. Son ajout à la viande modifie les propriétés de cette dernière, mais pose également des problèmes d'homogénéité lors du mélange ;
- A base de viande de bœuf, plus du mucilage. Le mucilage a un réel potentiel pour devenir un substitut salivaire et peut contribuer à la mastication et à la déglutition de la viande. Toutefois, sa consistance variant en fonction de son mode d'extraction, différentes conditions d'extraction de ce mucilage ont donc été testées :
    - Viande, plus 6 ou 18 % de mucilage extrait à froid sans sonication ;
    - Viande, plus 6 ou 18 % de mucilage extrait à froid avec 30 min de sonication ;
    - Viande, plus 6 ou 18 % de mucilage extrait à froid avec 60 min de sonication ;
    - Viande, plus 6 ou 18 % de mucilage extrait à chaud.

Chaque formulation a été préparée dans un bécher (format haut) afin de pouvoir mélanger la préparation pendant 3 min à 34 rpm, à l'aide d'une pale d'agitation (de dimensions 40 x 50 mm et percée de trous de 8 x 14 mm) montée sur un agitateur mécanique RZR 2021 (**Tableau 3.2**). Le **Tableau 3.6** donne les proportions des différents ingrédients pour chaque formulation. Lors de la préparation des formulations contenant de la gélatine, celle-ci a été intégrée à une température de 30 °C, le mélange se faisant alors dans un bain-marie thermostaté à la même température. Après mélange, toutes les préparations ont été placées dans une étuve thermostatée à 30 °C, soit la température utilisée lors de l'I3D, en attendant les mesures qui ont été réalisées le plus tôt possible après la préparation.

Tableau 3.6. *Composition des différentes formulations préparées pour l'évaluation des propriétés d'imprimabilité (mesures rhéologiques).*

	Viande (%)	Farine lupin (%)	Gélatine (%)	Mucilage (%)	Sel (%)
1	81	1	6	12	0
2	81	1	12	6	0
3	81	1	0	18	0
4	81	1	18	0	0
5	99	1	0	0	0
6	100	0	0	0	0
7	0	100	0	0	0
8	0	0	100	0	0
9	0	0	0	100	0
10	98,5	0	0	0	1,5

3.2.3. Mesures rhéologiques

Afin d'améliorer la lisibilité des graphiques, la nomenclature indiquée dans le **Tableau 3.7** a été utilisée.

Tableau 3.7. *Nomenclature des échantillons utilisés lors des mesures rhéologiques des différentes formulations de prototypes d'aliments.*

Echantillons	Codes
Mucilage extrait à froid sans sonication (t0)	M fr t0
Mucilage extrait à froid avec sonication 30 min (t30)	M fr t30
Mucilage extrait à froid avec sonication 60 min (t60)	M fr t60
Mucilage extrait à chaud	M ch
Viande pure	V-P
Viande salée	V-S
Viande + farine	V-F
Viande + 6 % de gélatine	V-G 6 %
Viande + 18 % de gélatine	V-G 18 %
Viande + 6 % de mucilage extrait à froid sans sonication (t0)	V-M fr t0 6 %
Viande + 18 % de mucilage extrait à froid sans sonication (t0)	V-M fr t0 18 %
Viande + 6 % de mucilage extrait à froid avec sonication 30 min (t30)	V-M fr t30 6 %
Viande + 18 % de mucilage extrait à froid avec sonication 30 min (t30)	V-M fr t30 18 %
Viande + 6 % de mucilage extrait à chaud	V-M ch 6 %
Viande + 18 % de mucilage extrait à chaud	V-M ch 18 %

3.2.3.1. Les géométries utilisées

Deux géométries de type plan/plan ont été utilisées pour les mesures de rhéologie afin de s'adapter au mieux aux différentes formulations (**Figure 3.18**) :

- Une géométrie de 60 mm de diamètre (P60) destinée aux mesures sur les mucilages. Cette géométrie à surface sablée, couplée à un réservoir, permet d'éviter le glissement des matières très fluides vers l'extérieur, tout en améliorant la sensibilité de la mesure grâce à sa surface plus importante. La même quantité de mucilage (9 mL) a été utilisée pour toutes les mesures ;
- Une géométrie de 35 mm de diamètre (P35) destinée aux matrices complexes telles que la viande ou la viande en mélange. Sa surface striée permet une adhésion optimale de l'échantillon lors de la mesure.

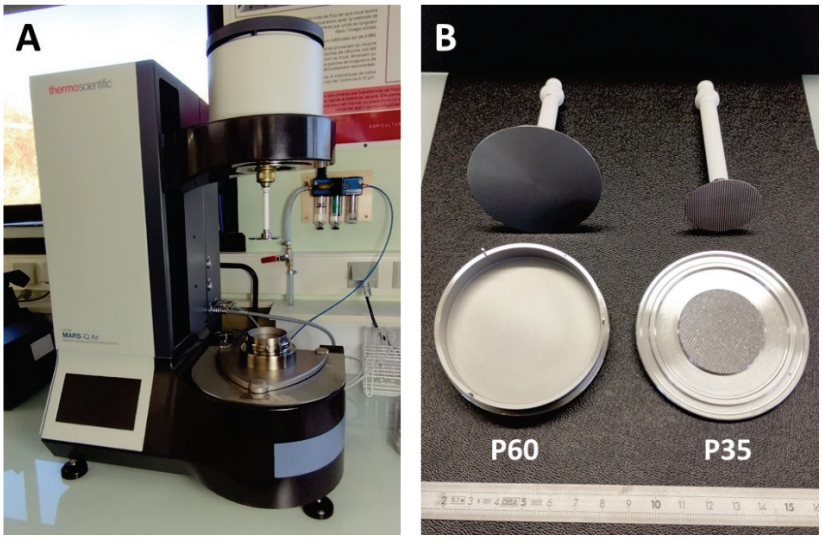


Figure 3.18. *Photographies : A – Rhéomètre HAAKE MARS iQ Air ; B – Géométries de type plan-plan de 60 et 35 mm de diamètre, utilisées pour caractériser le comportement rhéologique des différentes formulations d'aliments.*

Les géométries se composent d'un plateau en rotation et d'un plateau fixe. Dans une géométrie de type plan-plan, le fluide est cisaillé entre deux plans parallèles caractérisés par leur rayon r et l'entrefer h. L'un des plans est à l'arrêt, l'autre (plan supérieur) est en rotation à la vitesse angulaire ω (rad.s^{-1}). Le principal intérêt de cette géométrie est que la valeur de l'entrefer est réglable ; nous avons choisi une valeur de 1 mm lors de nos expérimentations. Cela présente les avantages suivants :

- Une adaptation à des quantités limitées de matière à analyser ;
- Une analyse d'échantillons contenant des particules. La taille de l'entrefer entre le plan mobile tournant et le plan inférieur doit être au moins égale à 10 fois la taille moyenne des particules présentes dans le matériau et au moins égale à 3 fois la taille de la plus grosse particule (selon les données du constructeur).

- La géométrie de type plan-plan est adaptée aux matériaux à forte viscosité (Reeve & Amigoni, 2008).

Néanmoins, les géométries de type plan-plan présentent l'inconvénient de générer dans l'entrefer un gradient de cisaillement inhomogène. En effet, ce gradient est nul au centre de l'échantillon et maximum à la surface libre *(i.e.* au niveau des bords de la géométrie), contrairement à une géométrie de type cône-plan. Cet effet peut affecter la caractérisation du fluide, en particulier si l'on est loin de son domaine de comportement Newtonien, ou si le fluide présente des comportements dépendant de la contrainte appliquée et du temps. Cependant, le fait que la valeur de cet entrefer soit adaptable permet une grande flexibilité d'utilisation. Le gradient de cisaillement peut être modifié, en faisant varier la vitesse de rotation ω ou la valeur de l'entrefer h. Réduire la taille de l'entrefer contribue à augmenter le taux de cisaillement (El Kissi, Nigen, & Pignon, 2006). Lors des mesures, le glissement de l'échantillon en dehors de la géométrie signifie qu'il y a perte de contact entre l'échantillon et les parois des outillages. Or, comme la condition d'adhésion est une condition essentielle lors de l'interprétation des résultats en rhéologie, les géométries utilisées présentent des surfaces traitées, *i.e*. sablées ou striées. A noter que, dans la présente étude, l'ensemble des mesures sur les formulations à base de viande ont été réalisées dans les mêmes conditions, une approche comparative a donc été mise en œuvre.

3.2.3.2. Les méthodes utilisées et les paramètres mesurés

Des mesures rotationnelles et oscillatoires ont été réalisées sur les différentes formulations. Le **Tableau 3.8** synthétise les méthodes programmées dans le logiciel *Rheowin Job Manager*, ainsi que les grandeurs mesurées.

Tableau 3.8. *Les différentes méthodes utilisées et les paramètres associés aux mesures sur le rhéomètre HAAKE MARS iQ Air. Le type de géométrie est défini par le diamètre (35 ou 60 mm) et par l'état de surface (strié pour la géométrie P35 et sablé pour la géométrie P60).*

Type de mesure	Type de géométrie	Grandeurs mesurées	Formulations concernées
Rotationnelle : Viscosité apparente	P35	$\eta = f(\tau)$	Préparations à base de viande
Rotationnelle : Comportement Newtonien	P60	$\tau = f(\dot{\gamma})$	Mucilages
Rotationnelle : Viscosité apparente	P60	$\eta = f(\tau)$	
Rotationnelle : Viscosité entre 20 et 50 °C	P60	$\eta = f(T)$	
Oscillatoire : Balayage en déformation (0 - 1000 %)	P35	$G', G'', \tan\delta = f(\gamma)$ ou (τ)	Préparations à base de viande
Oscillatoire : Balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1})	P35	$G', G'' = f(\omega)$	
Oscillatoire : Rampe de température (20-50 °C)	P35	$G', G'' = f(T)$	

Les mesures ont été répétées 3 fois, dans l'ordre du **Tableau 3.8**. La LVR a été déterminée à partir du balayage en déformation, ce qui a permis de réaliser le balayage en fréquence dans le domaine linéaire viscoélastique, lorsque l'échantillon n'était pas déstructuré (**Figure 3.19**).

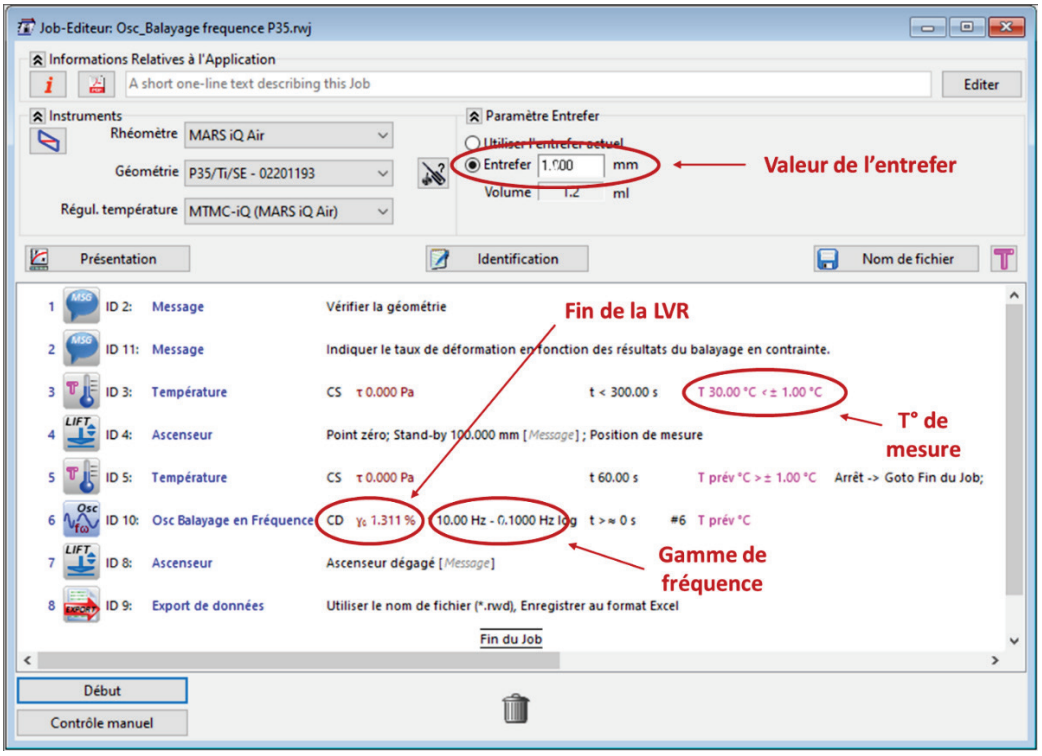


Figure 3.19. *Capture d'écran du logiciel Rheowin Job Manager (rhéomètre). Exemple d'une méthode de balayage en fréquence dans la région linéaire viscoélastique destinée aux mesures rhéologiques sur les formulations contenant de la viande.*

3.2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *Statistica* (**Tableau 2.9**, **Chapitre 2**). Les données ont été analysées par le test de Grubbs pour détecter les valeurs aberrantes. En fonction des données, différents tests statistiques ont été mis en œuvre :

- Analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées, en respectant les conditions de normalité et d'homoscédasticité des échantillons ;
- Le test de Tukey a été utilisé pour les comparaisons multiples *post-hoc*, le niveau de significativité étant fixé à $P < 0,05$;
- Les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM).

3.3. Résultats et discussions

Les résultats présentés dans cette partie se veulent être une première approche permettant de guider le choix des ingrédients en vue de la conception d'un aliment fonctionnel par I3D. La caractérisation du comportement rhéologique des différentes formulations contenant ces ingrédients permettra, à terme, de valider une ou plusieurs formulations à base de viande de bœuf. Ces formulations devront ensuite être étudiées en fonction de critères en lien avec la mastication (*in vitro*, puis *in vivo*). Des approches nutritionnelles, sanitaires et d'acceptabilité sociale permettront ensuite de finaliser la conception de l'aliment fonctionnel.

3.3.1. Comportement rhéologique des matières premières

3.3.1.1. Le mucilage

Comme le montre la **Figure 3.20**, le comportement rhéologique du mucilage est très variable selon le mode d'extraction mis en œuvre.

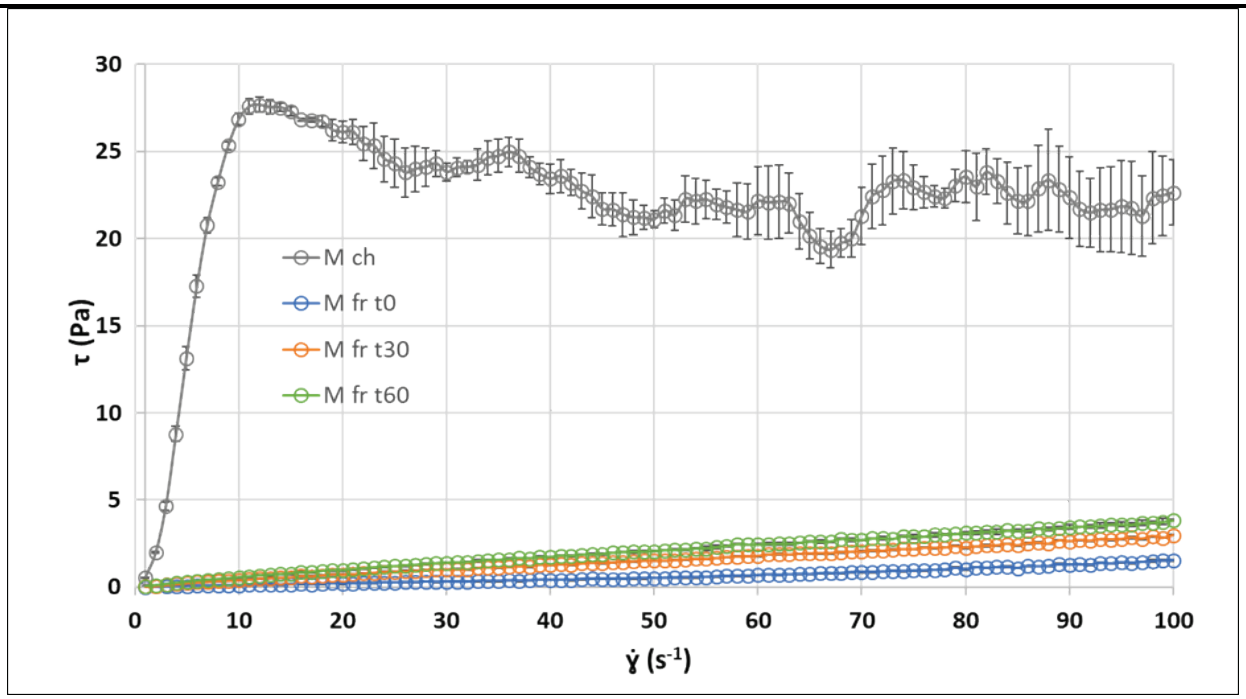


Figure 3.20. *Comportement rhéologique à 30 °C du mucilage de graines de lin en fonction du mode d'extraction mis en œuvre. Les temps indiqués pour les mucilages extraits à froid correspondent à des durées de sonication (min). Ces courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards à la moyenne (SEM).*

Les mucilages extraits à froid présentent un comportement Newtonien en fonction du taux de cisaillement, avec une contrainte mesurée toujours inférieure à 5 Pa, quel que soit le traitement appliqué (0, 30 ou 60 min de sonication). Le mucilage extrait à chaud a clairement un comportement non-Newtonien, très différent de celui d'un mucilage extrait à froid. La contrainte mesurée est d'ailleurs plus de 5 fois supérieure, mais présente une variabilité plus importante.

La viscosité apparente (ou dynamique) désigne la viscosité instantanée, à un instant t. Cette notion tient compte du fait que pour la plupart des produits, la viscosité mesurée dépend des contraintes de cisaillement qui lui sont appliquées. Seuls les fluides Newtoniens ont une viscosité constante (dépendante, malgré tout, de la température). La viscosité apparente est évaluée en calculant le rapport de la contrainte de cisaillement τ (Pa), sur la vitesse apparente de cisaillement (s^{-1}). Elle renseigne sur la fluidité d'un matériau. Son augmentation, associée à l'augmentation du taux de cisaillement (s^{-1}) traduit un comportement d'amincissement par cisaillement du matériau étudié ; une faible viscosité à un faible taux de cisaillement reflète une facilité d'extrusion du matériau (Yang et al., 2022).

La viscosité apparente des mucilages est également très différente, comme le montrent les **Figure 3.21a** et **Figure 3.21b**. Le mucilage extrait à chaud possède une viscosité apparente jusqu'à 60

fois supérieure à celle des mucilages extraits à froid, pour des contraintes de cisaillement nettement plus élevées. Une déstructuration du mucilage extrait à chaud est observée à partir d'une contrainte de 21 Pa (**Figure 3.21a**), alors que celles des mucilages extraits à froid présentent moins de variations, mais sont dépendantes du temps de sonication (pour un taux de cisaillement compris entre 1 et 100 s^{-1}). La viscosité étant plus faible en absence de sonication, la contrainte mesurée l'est donc également. Ceci pourrait également s'expliquer par des différences de concentration et d'interactions des chaines de polymères (**Figure 3.21b**). Ces profils de viscosité apparente sont différents des résultats obtenus par Azarpazhooh et al. (2021), où une diminution rapide de la viscosité avait été mesurée. Cette différence de comportement peut toutefois s'expliquer par le fait que les concentrations utilisées étaient très différentes : 0,5 à 2 % (Azarpazhooh et al., 2021) *vs.* des solutions pures (100 %), directement après extraction, dans notre cas.

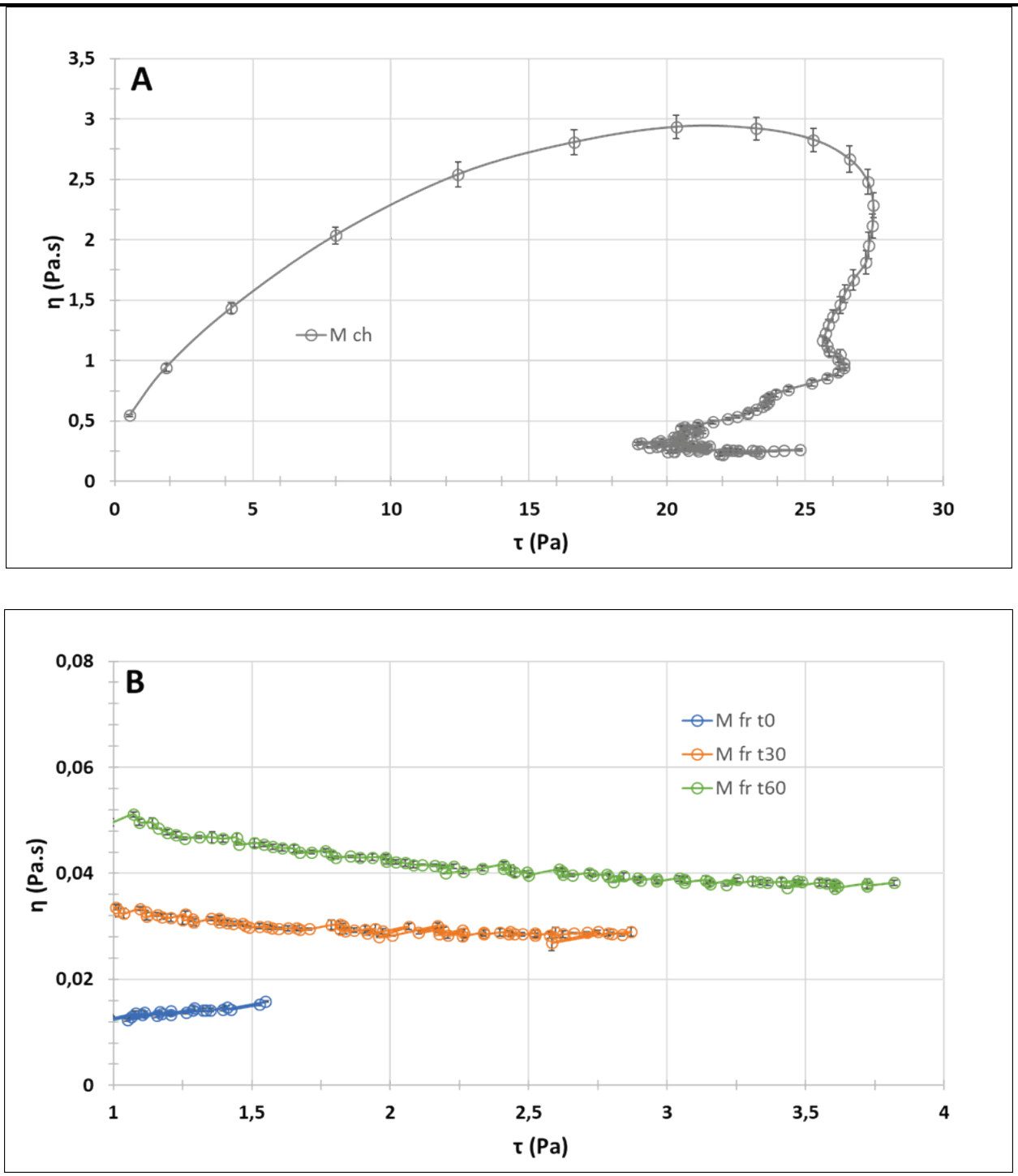


Figure 3.21. *Evolution de la viscosité apparente des différents mucilages, à 30 °C, en fonction de la contrainte de cisaillement : A – Mucilage extrait à chaud ; B – Mucilages extraits à froid avec des durées de sonication de 0, 30 et 60 min, respectivement. Ces courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM.*

Comme indiqué sur la **Figure 3.22**, la viscosité du mucilage extrait à chaud diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement, ce qui dénote un comportement pseudo-plastique et d'amincissement par cisaillement, typique des mucilages. Ceci est conforme aux résultats obtenus par Ma et al. (2019). Ce comportement peut être dû à l'alignement des chaînes de polymères dans la

direction de la force de cisaillement, ce qui tendrait à diminuer leurs interactions. Ces comportements sont moins visibles pour les mucilages extraits à froid, voire inversés en l'absence de sonication (**Figure 3.22**). Ceci est probablement dû à une concentration trop faible de ces solutions, qui ne favorise pas les interactions entre chaines de polymères. La sonication permettant potentiellement une meilleure extraction, la viscosité est plus élevée dans ces 2 cas (t30 et t60 min) par rapport à t0, mais reste faible. Ceci est en accord avec les travaux récents de (Joshi, Shabani, Kabir, Zhou, McClements & Park (2023) qui ont montré que, pour un taux de cisaillement donné, la viscosité apparente des échantillons dépendait du poids moléculaire des polysaccharides, ainsi que de leur structure.

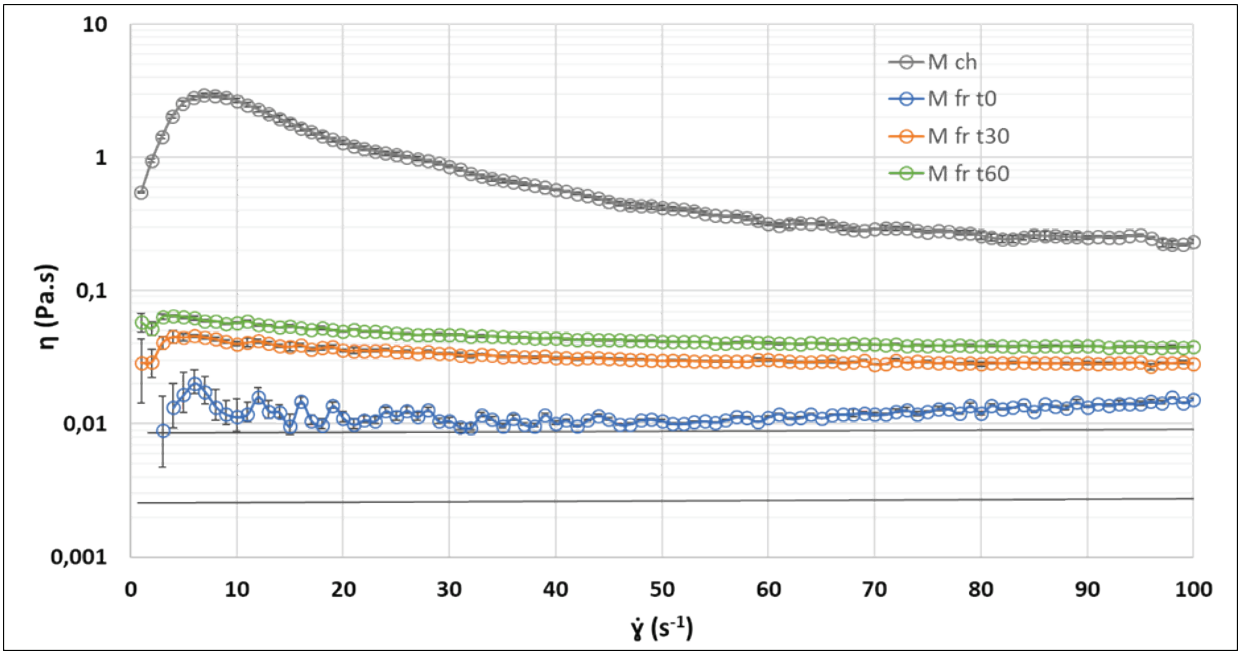


Figure 3.22. *Viscosités apparentes des mucilages, à 30 °C, en fonction du taux de cisaillement. Mucilages extraits à chaud et à froid avec des durées de sonication de 0, 30 et 60 min, respectivement. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

D'après la **Figure 3.23**, pour une déformation fixée à 7,0 s^{-1}, le comportement du mucilage extrait à chaud est linéaire et décroissant dans une gamme de température comprise entre 20 et 50 °C, soit celle correspondant aux températures pouvant être atteintes classiquement lors d'une extrusion. Pour l'ensemble des formulations contenant du mucilage, la viscosité diminue de façon régulière, confirmant ainsi les résultats de Ma et al. (2021). La diminution de la viscosité peut être liée à des mouvements plus rapides des molécules (polysaccharides), conduisant à une modification de l'agrégation des polymères du mucilage due à la réduction des interactions intermoléculaires (Pérez-

Orozco, Sánchez-Herrera, & Ortiz-Basurto, 2019). Ainsi, une quantité d'énergie moins importante est nécessaire pour induire l'écoulement. Pour les mucilages extraits à froid, on notera une instabilité de la mesure pour les conditions de sonication t0 et t60, qui peut être attribuée à un problème de sensibilité de l'appareil (faibles viscosités) pour t0 et, à l'éventuelle présence de particules de tégument pour t60 (certaines étant d'ailleurs visibles à l'œil nu). La condition de sonication à 30 min semble donc être à privilégier, au vu de la stabilité de la réponse à la température par rapport aux autres (**Figure 3.23**).

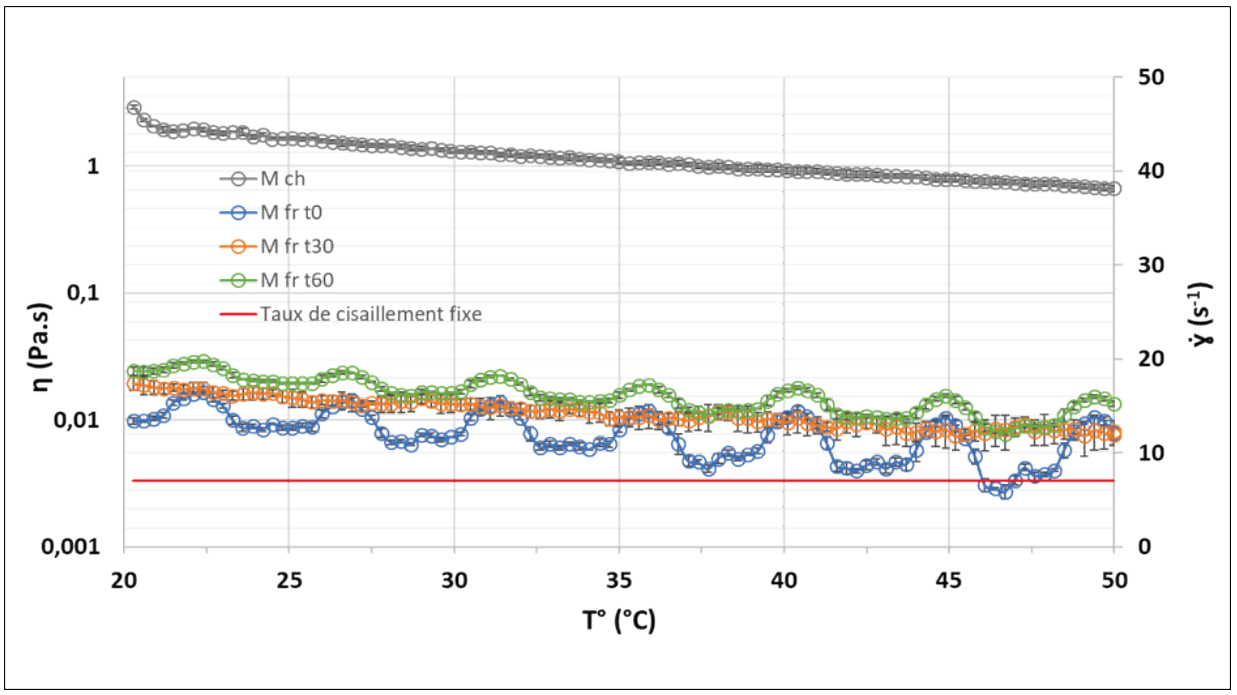


Figure 3.23. *Evolution de la viscosité des mucilages soumis à une rampe de température (20 à 50 °C). Le taux de cisaillement est fixé à 7 s^{-1}. Les temps indiqués pour les mucilages extraits à froid correspondent aux durées de sonication (0, 30 ou 60 min). Les courbes ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM.*

A la lecture de ces résultats, Il apparaît que le mucilage extrait à chaud possède une viscosité et une résistance à la contrainte nettement supérieures à celles des mucilages extraits à froid. L'extraction à chaud semblerait donc à privilégier si l'on veut assurer une meilleure stabilité à un futur aliment. Concernant les mucilages extraits à froid, dont la consistance se rapproche davantage de la salive humaine, plusieurs critères suggèrent qu'une condition de sonication de 30 min serait un compromis pertinent, vu que :

- La condition sans sonication présente une viscosité moindre, quand celles des conditions t30 et t60 sont plus proches ;

- Les conditions t0 et t60 apparaissent comme instables lorsque la température augmente ;
- La différence de viscosité entre les conditions t30 et t60 ne justifie pas une dépense énergétique supplémentaire due au temps de sonication plus long ;
- Le risque de générer des particules de grande taille est plus élevé à t60 ;
- Et vu qu'un temps de sonication long provoque un échauffement du mucilage qui pourrait nuire à ses propriétés (élévation de la température de la cuve de sonication d'au moins 10 °C au bout d'une heure).

3.3.1.2. Les préparations à base de viande

3.3.1.2.1. Mesures rotationnelles – Viscosité apparente

Le **Tableau 3.9** et la **Figure 3.24** montrent les résultats obtenus sur les différentes formulations contenant de la viande. Les valeurs de viscosité des formulations de viande contenant 18 % de mucilage sont significativement les plus faibles, ce qui dénote potentiellement une bonne qualité d'extrusion, mais aussi le risque d'altérer la cohésion entre les couches (Zheng, Zhang & Liu, 2021). A l'opposé, les formulations contenant majoritairement de la viande (V-P, V-S et V-F) présentent des viscosités apparentes élevées, notamment V-P. Pour un taux de cisaillement donné, une viscosité apparente élevée tend à faciliter la conservation de la géométrie 3D post-impression. Cependant, une valeur trop élevée entraîne une extrusion plus lente et hétérogène, conférant au produit imprimé une surface irrégulière (Dong et al., 2020), ce que nous avons observé pour la viande pure (à voir sur la **Figure 3.32**). Dans ce cas, la qualité d'impression est médiocre, avec un filament extrudé de façon discontinue. Les formulations contenant 6 % de mucilage ou de la gélatine présentent un comportement intermédiaire qui pourrait constituer un compromis intéressant, à la fois pour la qualité d'extrusion et pour la cohésion entre les couches. Ces résultats laissent à penser que le comportement d'amincissement par cisaillement des formulations testées ainsi que leur stabilité post-impression les rendent appropriés pour une impression 3D par extrusion (Anukiruthika et al., 2020).

Le fait que la viscosité apparente des différentes formulations diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement (**Figure 3.24**), une fois le maximum passé pour un taux de cisaillement donné (**Tableau 3.9**), peut être attribué à :

- La rupture des agrégats de particules, qui sont directement liés à ce taux de cisaillement (Polachini, Basso & Telis-Romero, 2017). Cela montre que les matériaux présentent un

comportement pseudo-plastique (fluide à amincissement par cisaillement) qui permet un écoulement facilité au travers de la buse d'impression ;

- La nature de l'amincissement par cisaillement indique que les particules sont fortement perturbées, lorsqu'elles sont soumises à une contrainte de cisaillement. La force entre les particules diminuant avec l'augmentation de la contrainte, cela provoque une chute de la viscosité (Yang et al., 2019).

Tableau 3.9. *Viscosités apparentes maximales et leur taux de cisaillement associés pour les différentes formulations testées (mesures rotationnelles). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les valeurs correspondent aux moyennes avec les SEM associées calculées à partir de 3 répétitions).*

Formulations	η apparente max (Pa.s)	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})
V-M ch 18 %	234 ± 2^{eg}	0,962
V-M fr t30 18 %	421 ± 16^{ef}	0,437
V-M fr t0 18 %	580 ± 28^{fg}	0,343
V-G 6 %	2027±91	0,251
V-M fr t30 6 %	2923 ± 89^{cd}	0,183
V-M fr t0 6 %	2940 ± 148^{b}	0,181
V-G 18 %	3217 ± 223^{bcd}	0,347
V-M ch 6 %	4443±212	0,197
V-F	5773 ± 24^{a}	0,125
V-S	6653 ± 172^{a}	0,133
V-P	8703±432	0,105

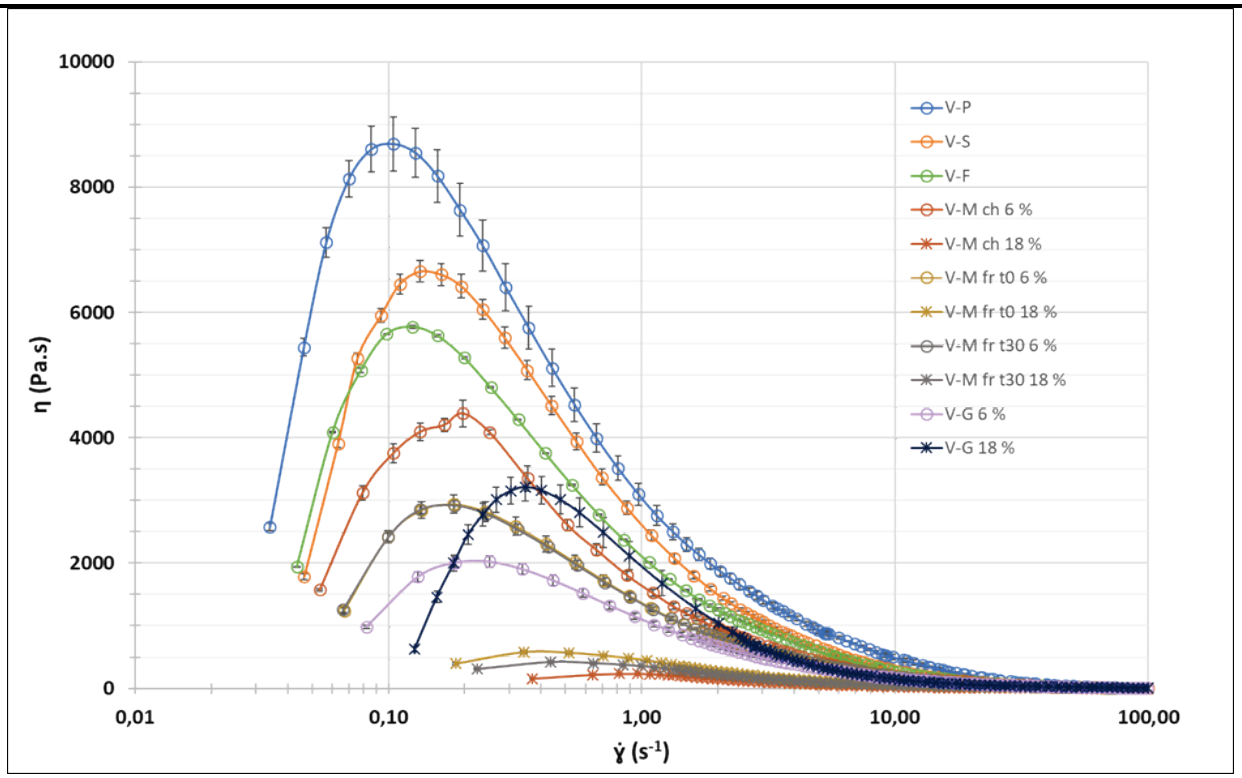


Figure 3.24. *Viscosités apparentes des différentes formulations, mesurées à 30 °C, en fonction du taux de cisaillement (entre 1-100 s^{-1}). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

Pour mémoire, la farine de lupin a été utilisée ici en tant qu'aide pour améliorer l'aspect visuel des formulations suite au post-traitement. Il apparaît, cependant, que la formulation V-F a le plus souvent un comportement intermédiaire entre les formulations V-P/V-S et les autres formulations (**Figure 3.24**). La viscosité apparente de la formulation V-F est différente de celle de la formulation V-P et des autres formulations, à l'exception de V-S. Malgré une concentration faible (1 %), ceci pourrait être dû à l'augmentation de volume de l'amidon après hydratation au contact de la viande.

3.3.1.2.2. Paramètres extraits des mesures oscillatoires

Le Tableau 3.10 rassemble les principaux paramètres rhéologiques obtenus par suite des mesures oscillatoires réalisées (*cf*. **Tableau 3.8**, section 3.2.3.2). Ces paramètres nous renseignent sur le comportement des matrices lors de l'I3D.

Tableau 3.10. *Moyennes des principaux paramètres extraits des courbes de rhéologie suite aux mesures oscillatoires. Les valeurs correspondent aux moyennes (± SEM, calculées à partir de 3 répétitions). Pour plus de lisibilité, les résultats des analyses statistiques ne sont pas indiqués dans ce tableau, mais sur les histogrammes présentés tout au long de cette section.*

Echantillons	G' max (Pa)	Fin LVR (%)	Seuil écoulement (Pa)	G'=G'' (%)	tan (δ)	Pente G' après LVR	G'' au repos (Pa)	Amplitude G' (Pa)
V-P	15780± 411	2,38± 0,05	350,87± 5,41	610,07± 4,97	0,308± 0,002	-0,627± 0,019	4223± 83	9093± 799
V-S	11727± 107	4,04± 0,19	443,13± 18,22	608,70± 10,39	0,299± 0,002	-0,638± 0,015	3147± 28	6227± 549
V-F	12877± 346	1,92± 0,09	230,43± 6,48	481,27± 4,61	0,317± 0,009	-0,637± 0,009	3660± 79	7997± 712
V-G 6 %	6830± 245	1,71± 0,16	110,09± 11,66	197,20± 9,88	0,331± 0,003	-0,610± 0,036	1987± 67	2673± 228
V-G 18 %	4671± 113	8,07± 0,74	345,13± 37,93	269,67± 9,22	0,217± 0,003	-0,746± 0,010	835± 21	1497± 132
V-M fr t0 6 %	8167± 211	2,11± 0,04	160,97± 5,12	332,73± 8,43	0,312± 0,005	-0,643± 0,000	2383± 41	5500± 487
V-M fr t30 6 %	8498± 59	1,80± 0,05	143,17± 4,23	351,63± 7,49	0,280± 0,005	-0,655± 0,009	2487± 12	4943± 441
V-M fr t0 18 %	2997± 9	1,40± 0,05	65,76± 25,71	203,73± 1,60	0,308± 0,008	-0,650± 0,014	872± 10	1843± 162
V-M fr t30 18 %	2603± 128	1,34± 0,09	32,54± 2,66	177,73± 2,17	0,319± 0,008	-0,688± 0,001	767± 29	1640± 144
V-M ch 6 %	11141± 1462	1,31± 0,23	123,88± 8,12	239,08± 35,18	0,291± 0,004	-0,629± 0,020	2330± 31	4910± 435
V-M ch 18 %	1566± 20	0,91± 0,02	13,52± 0,30	143,53± 3,54	0,349± 0,006	-0,622± 0,009	522± 12	918± 82

Ces paramètres sont détaillés sur les **Figure 3.25** à **Figure 3.36**, après classement par ordre croissant selon les différentes formulations. Les résultats des analyses statistiques sont indiqués sous forme de lettres sur les graphiques. Un test de Grubbs, effectué préalablement, n'a révélé aucune valeur aberrante pour l'ensemble des paramètres étudiés. Quelle que soit la formulation étudiée, les valeurs du module de perte G'' sont toujours inférieures à celles du module de conservation G' (**Figure 3.26**), ce qui signifie que les formulations ont un comportement se rapprochant d'un solide viscoélastique (Reeve & Amigoni, 2008).

3.3.1.2.2.1. Evaluation de la stabilité structurelle des matrices

La valeur maximale du module de conservation (G'max) renseigne sur l'énergie de déformation contenue dans le système et caractérise la partie élastique de l'échantillon (propriété de déformation

réversible). Selon Xu et al. (2023), la stabilité structurelle, associée à l'auto-portance (absence d'effondrement) du matériau, est donnée par l'amplitude des valeurs des modules G' et G''. Plus le module G' augmente avec la fréquence d'oscillation, plus la capacité de la matrice à supporter son propre poids s'améliore (Yang et al., 2022). C'est d'ailleurs la définition de l'imprimabilité donnée par Godoi et al. (2016). La **Figure 3.25** montre clairement que, dans le cas du module G', cette auto-portance est plus faible lors de l'ajout de mucilages ou de gélatine à hauteur de 18 %. La **Figure 3.26** illustre également ce phénomène pour le module de perte G''. En comparaison, une concentration en mucilage de 6 % semble plus adaptée pour maintenir la stabilité structurelle après I3D. A noter que le fait que les valeurs des modules G' et G'' soient plus faibles après ajout d'un ingrédient dans la viande ne signifie pas que l'aliment ne peut pas être imprimé, mais seulement que sa stabilité structurelle sera moindre que celle de la viande. Une amélioration des propriétés fonctionnelles nécessitera obligatoirement de trouver des compromis entre formulation et comportement rhéologique.

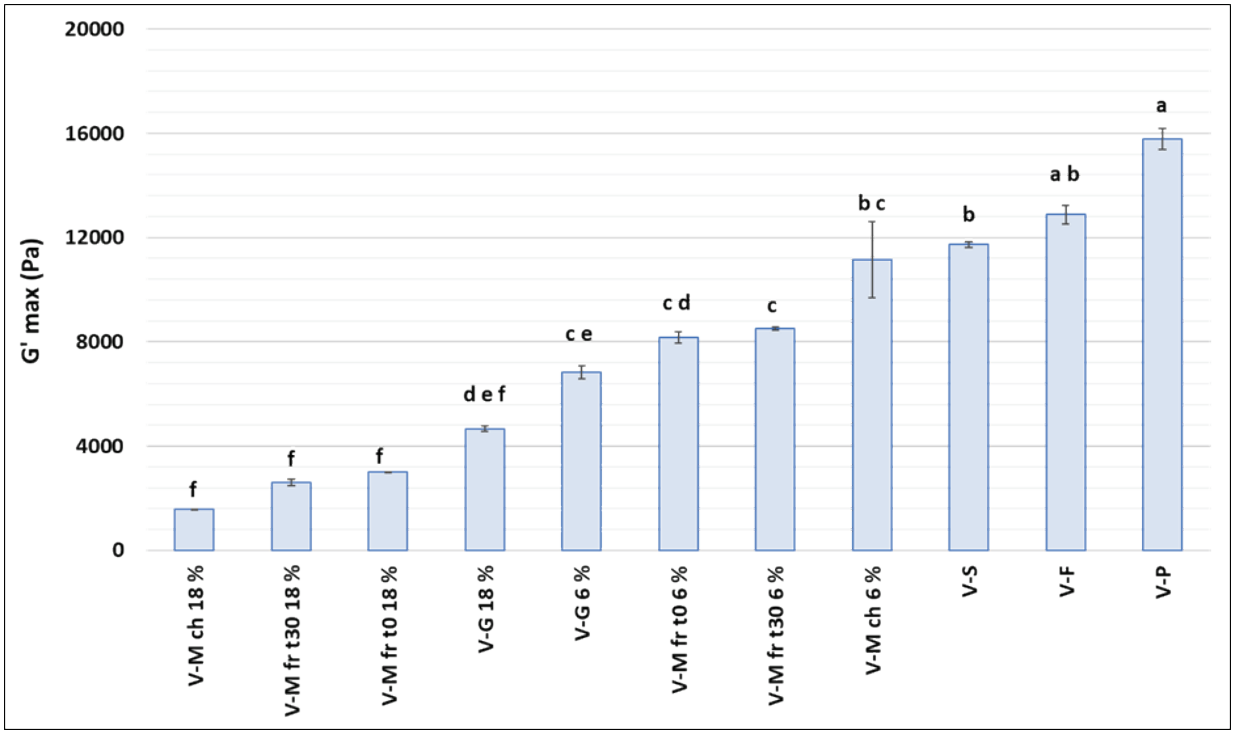


Figure 3.25. *Classement des formulations selon leur valeur de G'max lors d'un balayage en déformation (0-1000 s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

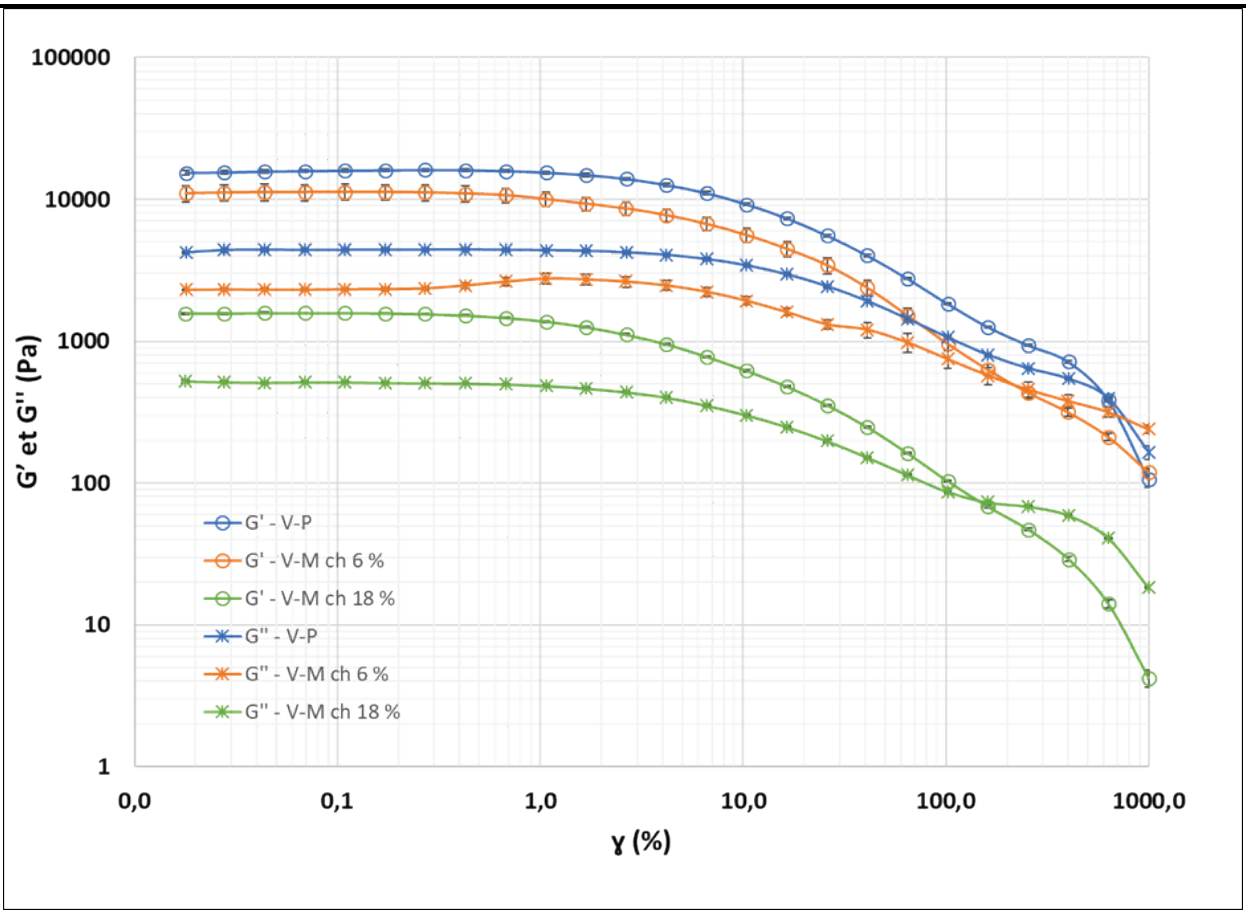


Figure 3.26. *Evolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') des formulations de viande pure (V-P) et de viande avec mucilage extrait à chaud (6 % et 18 %) mesurés lors d'un balayage en déformation (0-1000 %). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

Selon Thakur, Yadav & Goyal (2023), si le module G' augmente en fonction de la fréquence, cela conduit à une meilleure structure lors de l'I3D, car une certaine rigidité de la matrice peut être conservée. L'ensemble des formulations présentées sur la **Figure 3.27** correspondent à cette situation. Cette figure nous renseigne également sur la faible dépendance des modules G' et G'' vis-à-vis de la fréquence, avec un ratio G''/G' qui évolue peu. L'absence de croisement entre les courbes des deux modules suggère une stabilité de la microstructure interne des matrices (Kaur et al., 2018). Ceci peut révéler la présence de liaisons intermoléculaires fortes de type covalentes au sein de la matrice (Liu, Li, Du, Zhang, Yang & Zhang, 2019). D'après la **Figure 3.28**, la formulation viande pure (V-P) présente l'augmentation la plus importante du module G', suivie des formulations avec ajout de farine (V-F) et de sel (V-S). Les formulations avec les plus fortes concentrations en gélatine ou en mucilage semblent offrir les performances les plus médiocres quant à l'I3D. Dans le cas des mucilages, ceci peut être dû à un apport en eau trop important qui fragiliserait la structure de la matrice. C'est d'ailleurs ce qu'il est possible de remarquer sur la **Figure 3.24**, en termes de viscosité apparente pour une concentration en

mucilage extrait à froid de 18 %. Les viscosités mesurées sont très faibles par rapport aux autres formulations. Dans le cas de la gélatine, l'apport en eau peut également être une explication, mais il est également apparu, au cours des expérimentations, que la répartition de la gélatine dans la viande était hétérogène. En effet, la présence d'amas de gel, parfois visibles à l'œil nu, peut alors rompre la continuité de la structure. Il est possible également de soupçonner un effet de la température, bien que la préparation des formulations ait été réalisée sans dépasser 30 °C. En effet, le point de fusion de la gélatine est autour de 35 °C (Toniciolli Rigueto et al., 2022) et, des modifications de la structure secondaire des protéines de la viande sont possibles dès 30 °C (Tornberg, 2005). Nous reviendrons sur ce point un peu plus tard, notamment afin de comprendre l'effet de la température sur les modules G' et G''.

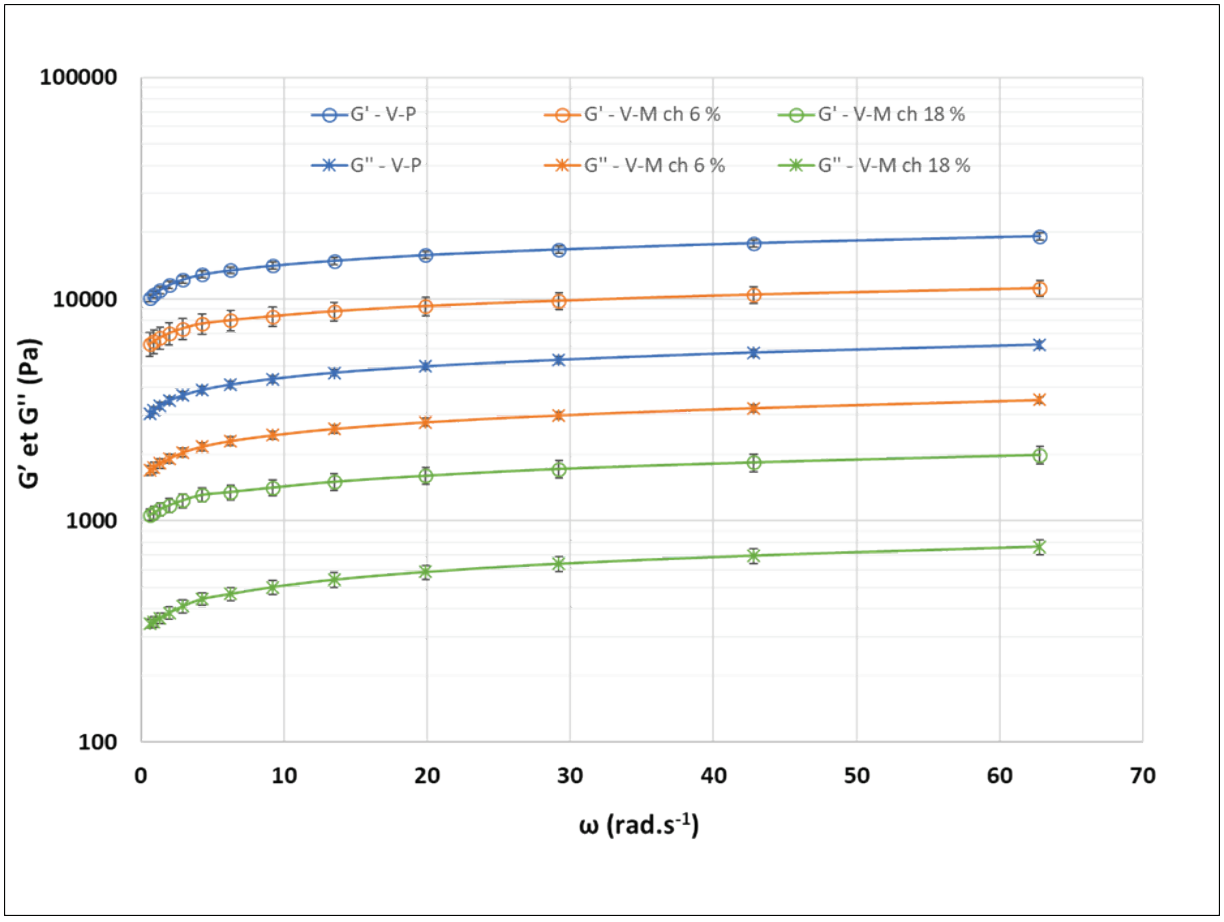


Figure 3.27. *Evolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') des formulations de viande pure (V-P) et de viande avec mucilage extrait à chaud (6 et 18 %) lors d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

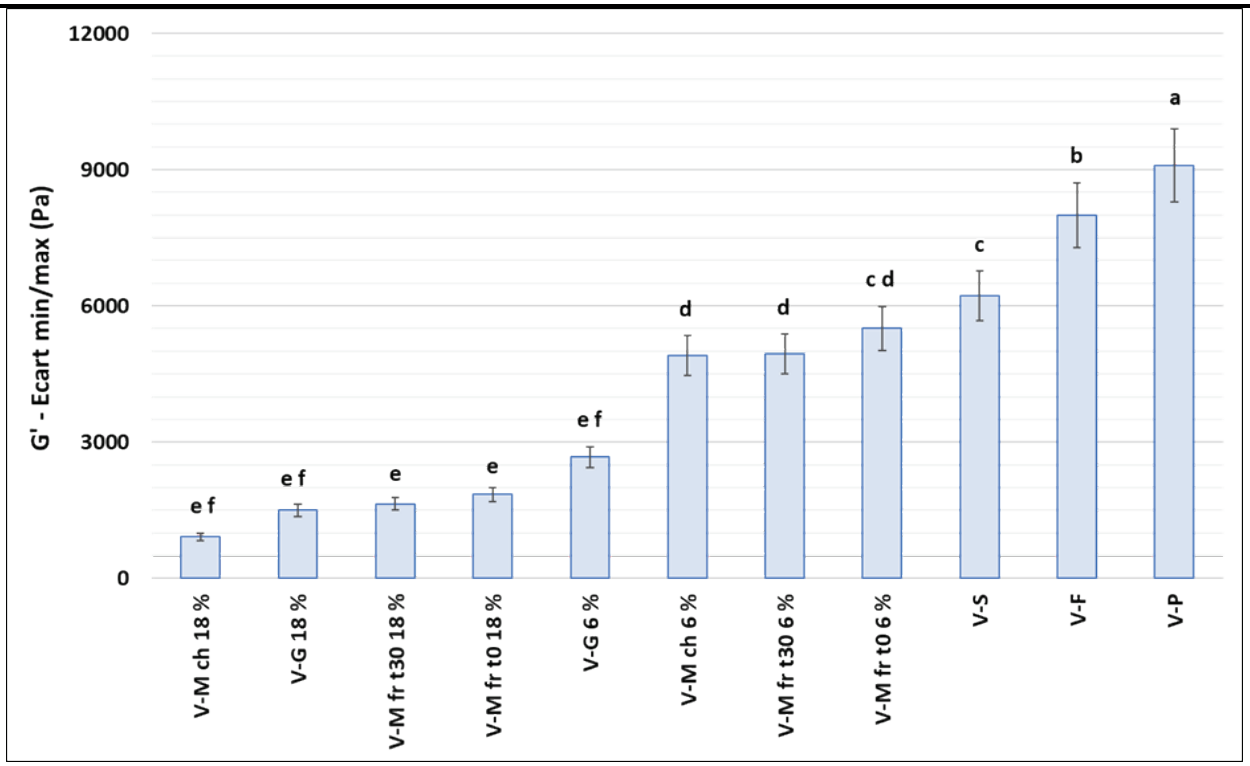


Figure 3.28. *Classement des formulations selon l'amplitude du module de conservation (G') lors d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.2. Evaluation de la résistance à la déstructuration

La longueur de la Région (ou domaine) Viscoélastique Linéaire (LVR) permet d'évaluer la résistance d'un matériau à la déstructuration (**Figure 3.6** et **Figure 3.7**). Plus la LVR est longue et plus la contrainte devra être élevée pour affecter la microstructure du matériau, en perturbant les interactions responsables de sa solidité. La fin de la LVR correspond à la limite d'élasticité (Liu, Chen, Zheng, Xie & Chen, 2020).

La **Figure 3.29** montre que la longueur de la LVR varie assez peu entre les différentes formulations, à l'exception de la formulation contenant de la viande et 18 % de mucilage extrait à chaud (valeur plus faible), ou celles avec ajout de sel (V-S) et, surtout, en présence de 18 % de gélatine (V-G 18 %) où les valeurs sont beaucoup plus élevées. Les mucilages ayant des teneurs en eau très élevées, il est normal qu'un apport conséquent exerce une influence négative sur la résistance à la déstructuration des échantillons.

L'ajout de sel dans des produits d'origine musculaire permet de stabiliser la formulation et de

favoriser l'imprimabilité. Ce phénomène a notamment été observé dans du surimi contenant une concentration en NaCl identique (1,5 %) (Wang et al., 2018). L'ajout de sel dans de la viande va favoriser la solubilisation des protéines myofibrillaires et permettre la formation de liaisons à faible énergie. Même si la valeur de G'max de la viande pure reste plus élevée (pas de solubilisation et, donc une structure non affectée) (**Tableau 3.10**), celle correspondant à la viande salée est supérieure à celles des formulations contenant de la gélatine ou du mucilage. Les résultats de viscosité apparente présentés *supra* (**Figure 3.24**) viennent confirmer la meilleure imprimabilité de la viande salée par rapport à celle de la viande pure (diminution de la viscosité) qui, comme nous l'avons évoqué précédemment, s'imprime difficilement.

L'ajout de 18 % de gélatine (**Figure 3.29**) à la viande permet d'augmenter sa résistance à la déstructuration de manière très significative. A la température expérimentale (30 °C), la gélatine utilisée est dans un état intermédiaire entre un gel et un liquide. Le mélange à la viande est donc délicat et il est probable qu'une partie de la gélatine se soit répartie entre les myofibrilles et qu'une autre partie soit restée sous la forme d'amas de gel (ce qui a été observé visuellement). La gélatine utilisée ayant un indice Bloom égal à 300, ce qui signifie qu'elle contient des chaînes protéiques de grande longueur (*cf*. **Chapitre 2**). La viande ayant été broyée sous azote liquide, la longueur des chaînes myofibrillaires a dû être impactée et réduite. La répartition des chaînes de polymères issus de la gélatine peut alors expliquer l'augmentation de la résistance à la déstructuration. Dans le **Chapitre 2**, les balayages en déformation réalisés sur des gels de gélatine d'indices Bloom 125 et 200 (cette fois-ci à 20 °C, sur une géométrie identique) ont permis d'obtenir des valeurs de LVR 10 fois supérieur à celles de la viande (après homogénéisation des unités de mesure), montrant ainsi une élasticité importante de ces polymères. La contribution de l'actine et de la myosine à la structuration de la matrice viande a été profondément affectée lors du broyage. Mais, selon (Park, Lee, Kim & Park, 2023), la gélatine (et sa réticulation) agit comme un agent plastifiant et favorise la formation de structures stables, en contribuant à la formation d'une microstructure interne continue grâce à leurs interactions avec l'eau, les protéines et les lipides.

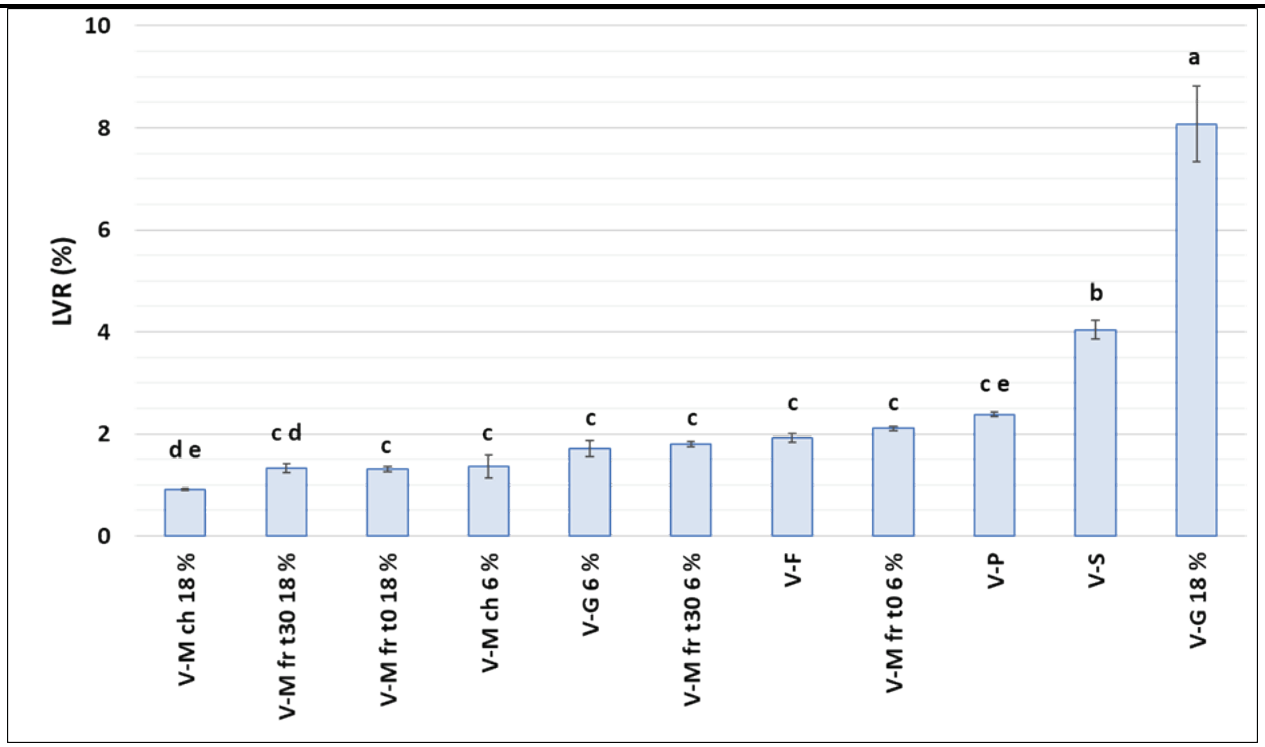


Figure 3.29. *Classement des formulations selon la longueur de leur Région Viscoélastique Linéaire (LVR) lors d'un balayage en déformation (0-1000 s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.3. Evaluation de la vitesse de déstructuration

Le seuil d'écoulement correspond au point où les modules de conservation et de perte sont égaux (G' = G''). Il permet de déterminer la contrainte minimale de cisaillement à appliquer pour que le matériau commence à s'écouler (Zheng et al., 2021). La **Figure 3.30** montre que les formulations à base de mucilage, riches en eau, se déstructurent à des contraintes de cisaillement faibles par rapport aux formulations V-S, V-P, V-G 18 % et V-F. Ces résultats sont à mettre en parallèle de ceux obtenus *supra* et relatifs à la résistance à la déstructuration. Malgré une résistance à la déstructuration plus importante mesurée en fonction de la vitesse de cisaillement, la formulation V-G 18 % se déstructure pour des contraintes plus faibles que la viande salée (V-S). La contrainte appliquée force les éléments structurels des matrices à changer de position de façon irréversible. Ceci a pour conséquence un effondrement du réseau qui correspond à la transition solide-liquide. Compte-tenu des résultats obtenus précédemment, il est possible que le réseau de gélatine soit donc réparti de manière hétérogène, accélérant ainsi le phénomène de transition.

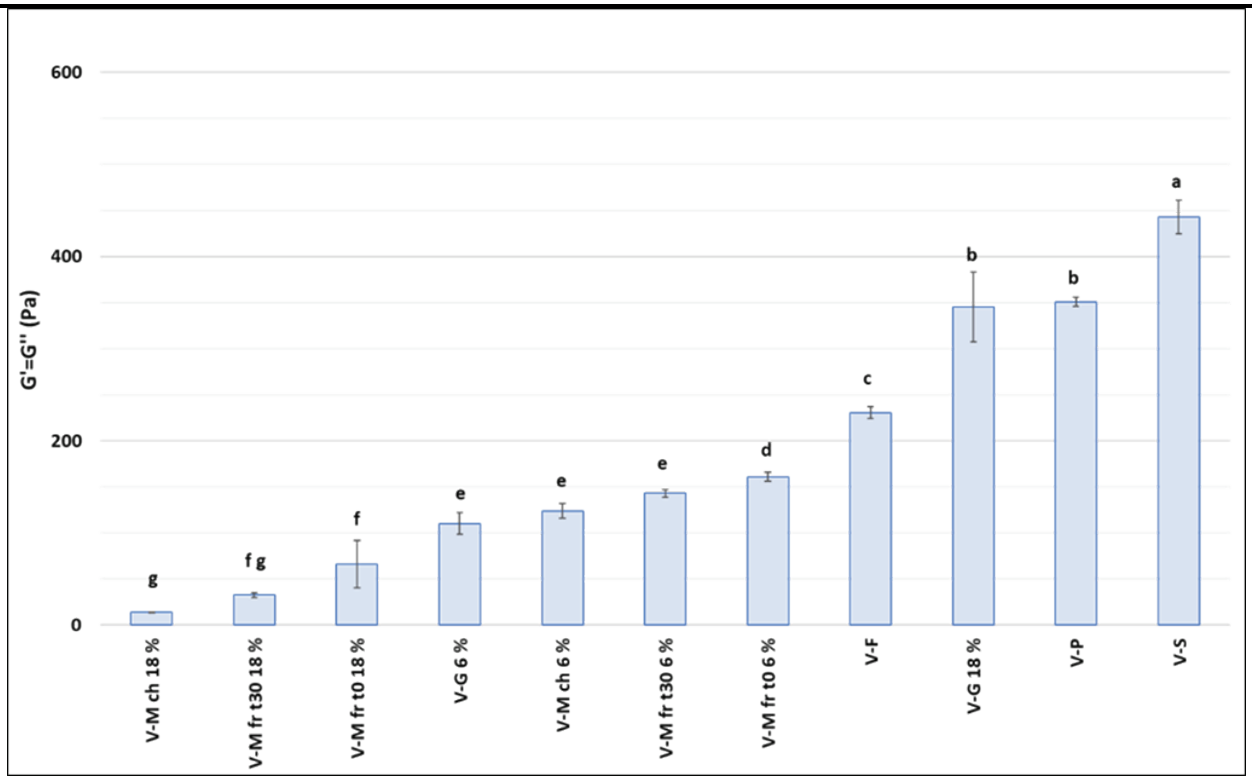


Figure 3.30. *Classement des formulations selon leur seuil d'écoulement (contrainte minimale) en fonction de la contrainte de cisaillement (τ). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.4. Evaluation de la difficulté d'extrusion

La difficulté à extruder une matrice est un paramètre important en vue d'évaluer son imprimabilité. Le croisement des courbes G' et G'' (G' = G'') en fonction de la déformation de cisaillement (%) permet de classer les différentes formulations en fonction de ce paramètre. Les formulations contenant le plus d'eau, ou celles ayant une concentration en gélatine suffisamment faible, offrent une capacité d'extrusion supérieure, notamment du fait d'une viscosité plus faible (**Figure 3.24**). Intuitivement, les formulations les plus structurées (V-P, V-S, V-F) sont les plus difficiles à extruder. Ceci a d'ailleurs pu être vérifié expérimentalement avec des différences significatives au niveau du croisement G' = G'' (**Figure 3.31**), mais également lors de l'impression de viande pure. Même si celle-ci s'extrude, le filament obtenu est discontinu. Pour finir, le respect de la géométrie 3D est médiocre (**Figure 3.32**), confirmant ainsi le fait que la capacité d'impression de la viande est mauvaise (Dong et al., 2023).

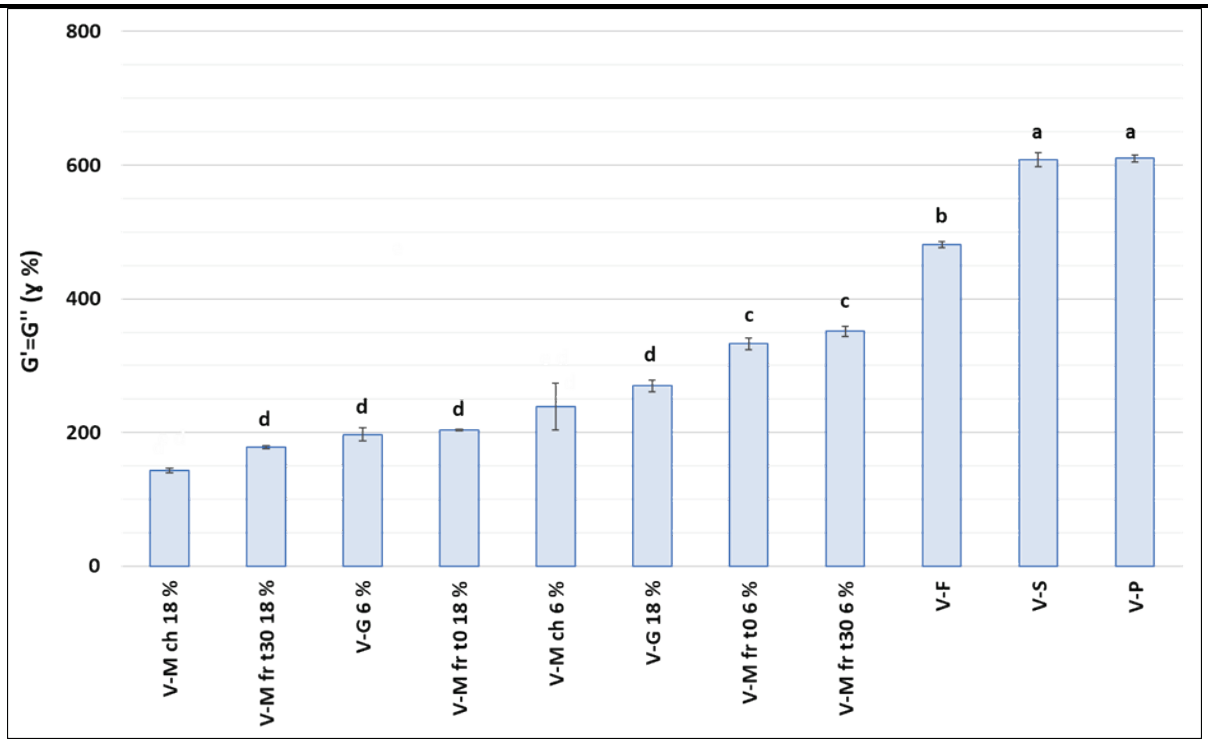


Figure 3.31. *Classement des formulations selon leur difficulté à être extrudées (G' = G'' en fonction de la déformation de cisaillement γ %). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (Analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

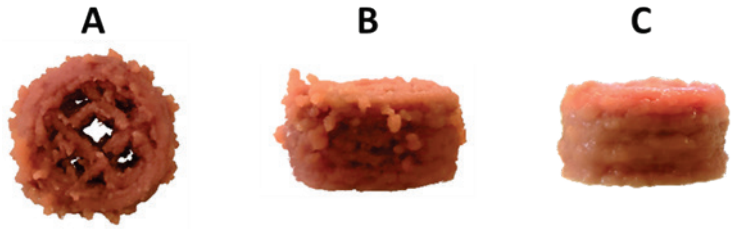


Figure 3.32. *Formulations de viande de bœuf imprimées en 3D avec l'imprimante Ghost modifiée (**Chapitre 2**). A – Viande pure, vue de dessus ; B – Viande pure, vue de face ; C – Viande + 6 % de mucilage extrait à chaud + 9 % de gélatine (tous les échantillons contiennent 1 % de farine de lupin).*

3.3.1.2.2.5. Evaluation de la force du réseau – élasticité

L'analyse des valeurs moyennes du facteur d'amortissement (tan δ) indique un comportement global des formulations éloigné d'un liquide et proche d'un solide (tan δ < 1), avec relativement peu de différences entre les formulations (**Figure 3.33**). D'après les travaux de (Yang et al., 2022) sur de la viande poulet, des valeurs de tan δ < 1 sont le signe d'une structuration de la matrice en réseau de gel, ce qui permet d'augmenter la résistance et l'élasticité. Ceci est confirmé par Thakur et al. (2023) qui ont montré que l'ajout d'un ingrédient végétal (en l'occurrence, de la gomme de konjac) dans une

préparation permettait de diminuer le facteur d'amortissement, améliorant ainsi la flexibilité et l'élasticité de la matrice et, de ce fait, sa structuration 3D. Il est cependant suggéré que, dans le cas de formulations contenant des protéines et des polysaccharides, la valeur du facteur d'amortissement doit être supérieure à 0,16, pour qu'il soit possible d'extruder la matrice (Joshi et al., 2023). A noter que les protéines utilisées cette étude de étaient d'origine végétale, la valeur annoncée de tan δ = 0,16 pourrait donc être différente pour des protéines d'origine animale.

Afin de concevoir des aliments à base de viande qui soient adaptés à des personnes souffrant de dysphagie, Dick et al. (2020) ont utilisé des hydrocolloïdes. Contrairement aux travaux de Azam et al. (2018), ceux-ci étaient destinés à réduire la fermeté et la cohésion des échantillons à base de viande pour en faciliter la mastication. L'ajout de ces hydrocolloïdes a influencé le comportement rhéologique des aliments, en faisant que les propriétés tendent vers plus d'élasticité (diminution de la tan δ). Ce changement de comportement a été expliqué par l'apparition de cavités de taille hétérogène, suggérant un pouvoir de rétention en eau supérieur.

L'ensemble des formulations étudiées dans ce chapitre présente un comportement équivalent. Une valeur plus faible du facteur d'amortissement est néanmoins relevée pour la formulation V-G 18 %, ce qui tend à rapprocher son comportement de celui d'un solide (**Figure 3.34**), avec une limitation des mouvements entre les molécules et de la chaleur émise par friction (Nijdam et al., 2021). Ceci est en accord avec les résultats de résistance à la déstructuration et confirmerait l'hypothèse de la formation d'un réseau de gel entre les protéines myofibrillaires énoncée *supra*. Nous observons aussi une baisse de la valeur de tan δ (**Figure 3.34**), en présence de 18 % de gélatine aux basses fréquences (jusqu'à 2,92 rad.s^{-1}), ce qui peut potentiellement signifier une perte de cohésion du réseau viande/gélatine. L'augmentation du facteur d'amortissement après cette valeur indique une régénération rapide des interactions après la perturbation oscillatoire, avec une augmentation du caractère élastique du produit.

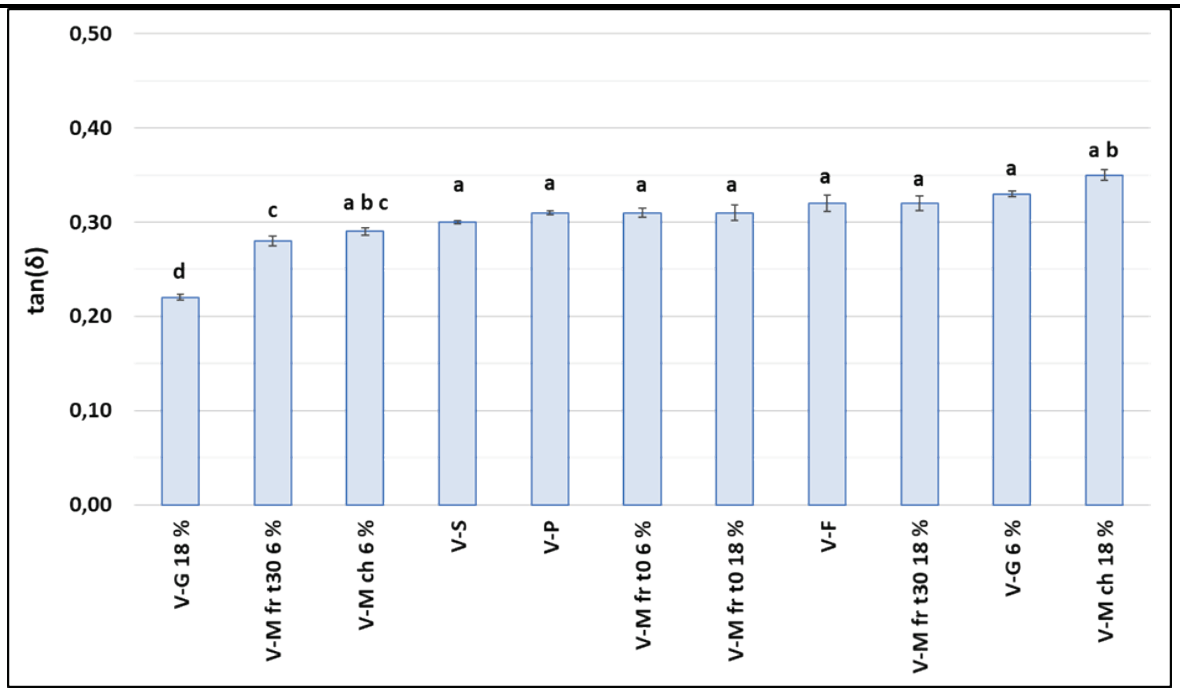


Figure 3.33. *Classement des formulations selon la valeur du facteur d'amortissement calculé et, représentant la force du réseau interne et son élasticité : tan (δ) = f (ω rad.s^{-1}). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

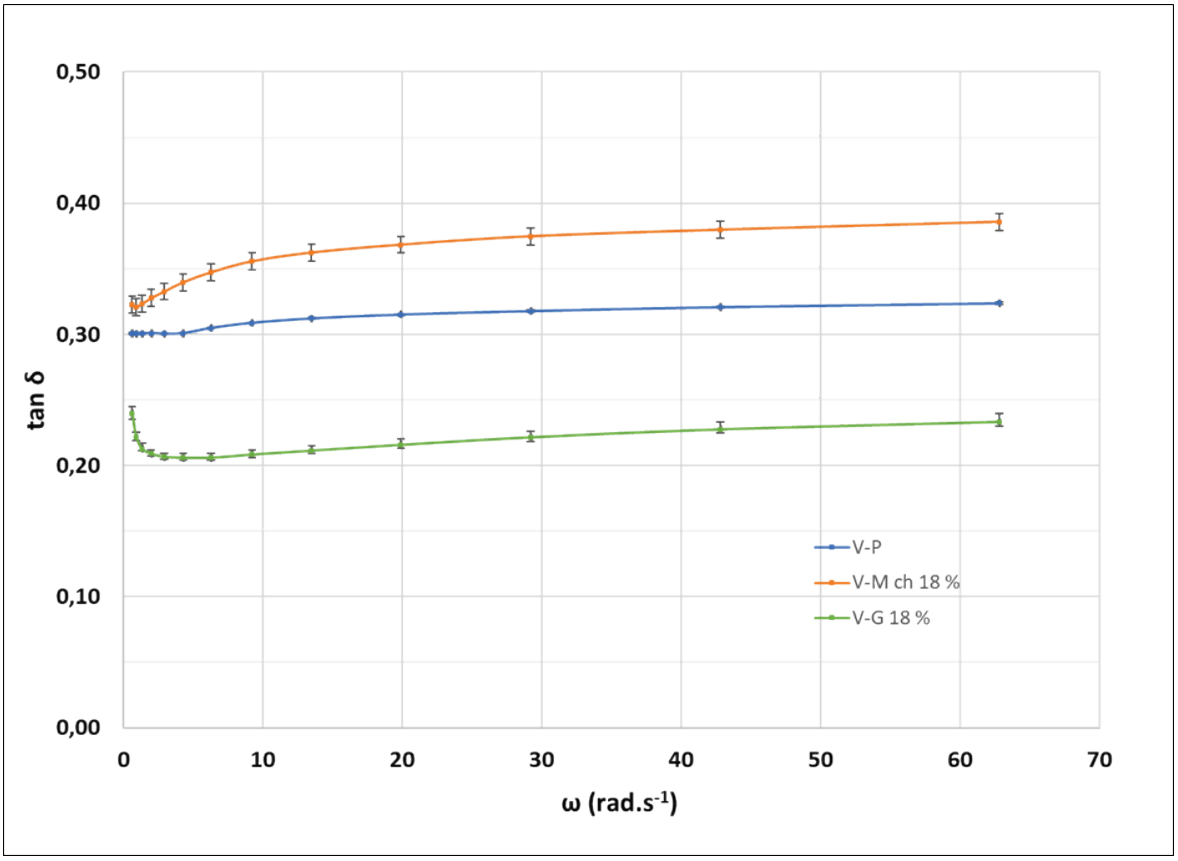


Figure 3.34. *Représentation graphique du facteur d'amortissement (tan δ) moyen calculé à partir d'un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.6. Evaluation de la cohésion des matrices

La pente du module de conservation G', après le seuil d'écoulement, permet d'évaluer la cohésion d'un matériau au travers de sa vitesse de déstructuration (**Figure 3.6**). Un matériau cohésif se déstructurant lentement, la pente sera plus faible. La **Figure 3.35** nous permet de constater que la cohésion des différentes formulations est relativement homogène. L'ajout de gélatine permet néanmoins d'améliorer cette cohésion, probablement en raison de la formation d'un réseau de gel entre les protéines myofibrillaires. Les résultats concernant les formulations contenant du mucilage extrait à froid (V-M fr t30 18 % et, dans une moindre mesure, V-M fr t30 6 %) sont plus surprenants. En effet, malgré une viscosité moindre et une vitesse de déstructuration nettement plus élevée que la formulation V-G 18% (**Figure 3.35**), leur cohésion ne semble pas significativement différente. Le réseau polysaccharidique du mucilage pourrait expliquer ce phénomène, en agissant de la même façon que la gélatine. D'ailleurs, Kaewmanee et al. (2014) ont mis en évidence que le mucilage permettait de créer un réseau de biopolymères empêchant la coalescence des bulles d'air et, contribuant par la même à l'homogénéité structurale à la matrice. La teneur en eau du mucilage extrait à froid, 3 fois plus élevée que celle du mucilage extrait à chaud, pourrait favoriser la répartition du mucilage dans la préparation de viande, et ainsi, contribuer à obtenir une structure plus homogène.

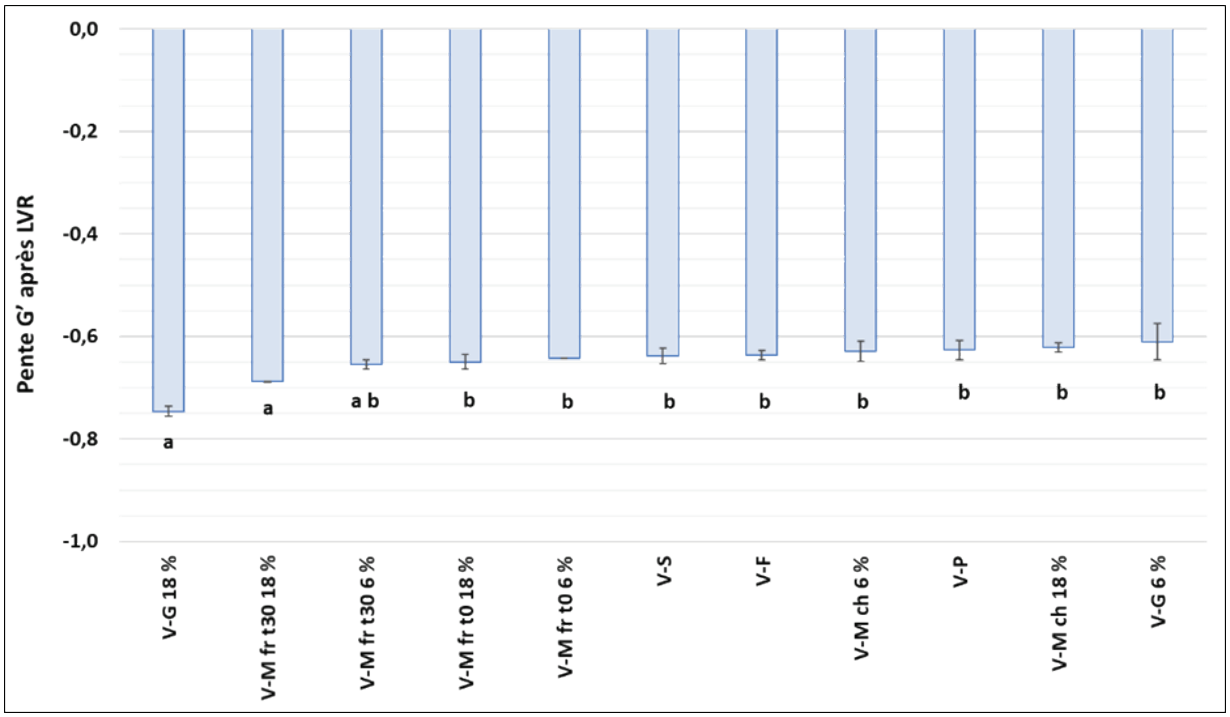


Figure 3.35. *Classement des formulations selon la cohésion de la matrice (calcul de la pente de la courbe du module de conservation – G' après le seuil d'écoulement). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.7. Evaluation de la limitation de l'écoulement avant impression

Lors de l'extrusion d'un matériau en I3D, celui-ci ne doit pas s'écouler sous l'effet de la gravité. Ceci est particulièrement important lors des phases de changement de direction de la tête d'impression si l'on veut obtenir un objet conforme à la modélisation 3D. Le système de dosage de précision Precifluid®, intégré à l'imprimante 3D Ghost modifiée (**Chapitre 1**), permet de gérer ce problème par une maîtrise du pilotage de la rétractation du matériau et du fait de sa non-sensibilité aux variations de viscosité. Cependant, dans le cas d'une transposition des formulations vers des imprimantes 3D commerciales, comme cela est prévu dans le cadre de l'ANS SAMASTIC (**Annexe V 2**), pour lesquelles le dimensionnement des buses est différent, le réglage des paramètres de rétractation est difficile, voire impossible. Le matériau utilisé ne doit donc pas s'écouler en dehors des phases de poussée du piston. Le module de perte (G'') est un paramètre qui permet d'évaluer cet écoulement pendant les phases de repos (absence de contrainte). Plus les valeurs du module G'' seront élevées, plus l'écoulement sera limité (Masbernat, 2021). La **Figure 3.36** montre que les formulations testées conduisent à des comportements en termes d'écoulement au repos qui sont hétérogènes. Les formulations possédant les viscosités apparentes les plus élevées (**Figure 3.24**) sont les moins sujettes

à l'écoulement. Malgré des différences significatives entre les formulations (**Figure 3.36**), des essais d'I3D ont permis de vérifier le comportement lors de l'extrusion des formulations à base de mucilage et de gélatine en utilisant le système Precifluid®. Des essais de comportement sur une machine commerciale sont prévus à court terme.

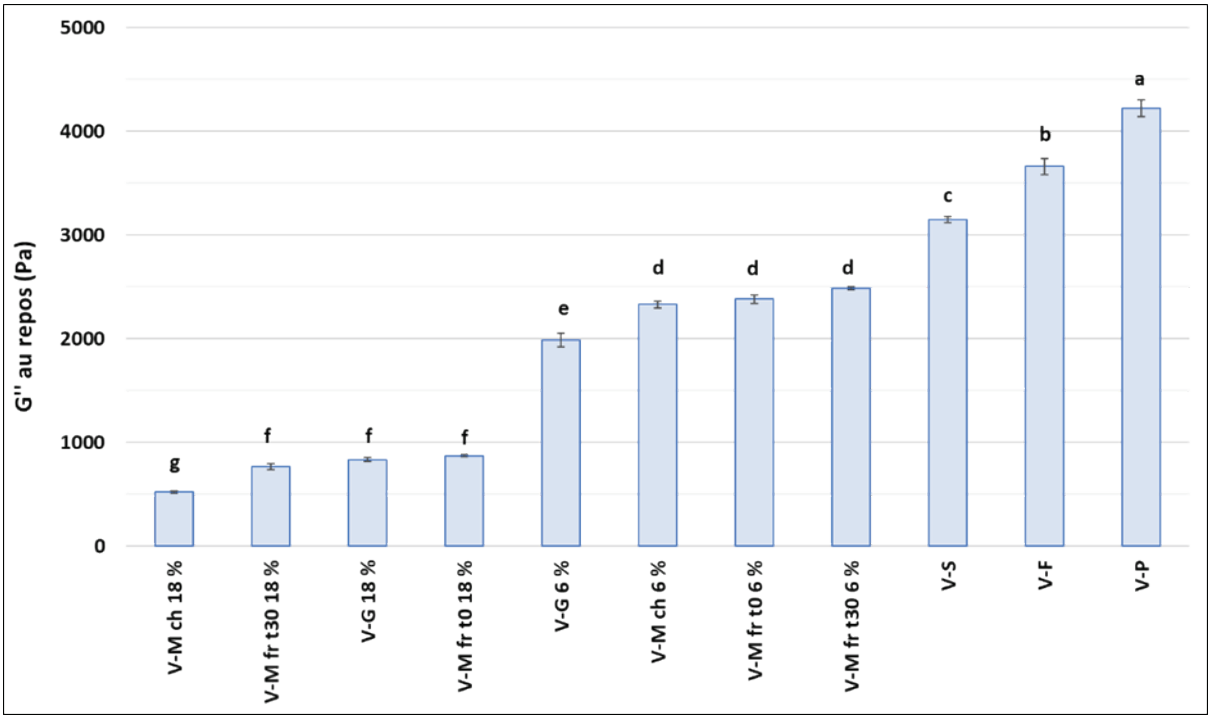


Figure 3.36. *Classement des formulations selon la limitation de l'écoulement avant impression (valeur du module de perte – G'' au repos au cours d'un balayage en déformation). Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.1.2.2.8. Comportement d'amincissement par cisaillement

Le comportement d'amincissement par cisaillement est considéré comme un paramètre essentiel pour la réussite du processus d'I3D alimentaire (Jiang et al., 2019 ; Wen, Kim & Park, 2022 ; Dong et al., 2023 ; Thakur et al., 2023 ; Xu et al., 2023). La viscosité complexe, η* (Pa.s), permet de discriminer des formulations en fonction de leur capacité d'amincissement. Pour rappel, η* correspond à la viscosité mesurée en régime sinusoïdal aux faibles déformations, pour lesquelles le produit n'est pas déstructuré.

La **Figure 3.37** montre que, pour toutes les formulations, η* diminue lorsque la fréquence (ω) augmente. Cela indique que le comportement d'amincissement par cisaillement (ou de pseudo-plasticité) est associé à l'écoulement pendant l'extrusion (le mouvement du fluide est initialement difficile à des vitesses de déformation lentes, mais s'écoulera plus librement à des vitesses élevées) et

à l'absence de déformation de la forme après l'impression. Toutes les matrices alimentaires présentant ces caractéristiques peuvent être extrudées, car la constitution d'un filament est possible (Park et al., 2023). Toutes les formulations contenant des quantités importantes de mucilage ou de gélatine (18 %) présentent des viscosités plus faibles à basse fréquence, signe que l'écoulement est favorisé dès le début de l'extrusion.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Dong et al. (2023) sur des produits à base de viande. Selon Xu et al. (2023), un comportement d'amincissement par cisaillement renseigne également sur la structure moléculaire de la matrice. Ce comportement traduirait un repositionnement des chaînes de polymère en vue d'un réalignement. En utilisant le simulateur présenté en section 3.2.1, nous avons tenté de vérifier ce point à partir d'un marquage immunologique[29] des matrices avant et après extrusion. Mais, comme l'intégrité des fibres musculaires avait été fortement impactée par le broyage, il a été impossible d'identifier des structures pouvant constituer des marqueurs de position ; seuls des fragments de fibres musculaires ont pu être repérés. La **Figure 3.38** illustre le phénomène d'amincissement décrit *supra* en sortie de buse.

[29] Utilisation d'un anticorps polyclonal anti-laminine (protéine du tissu conjonctif).

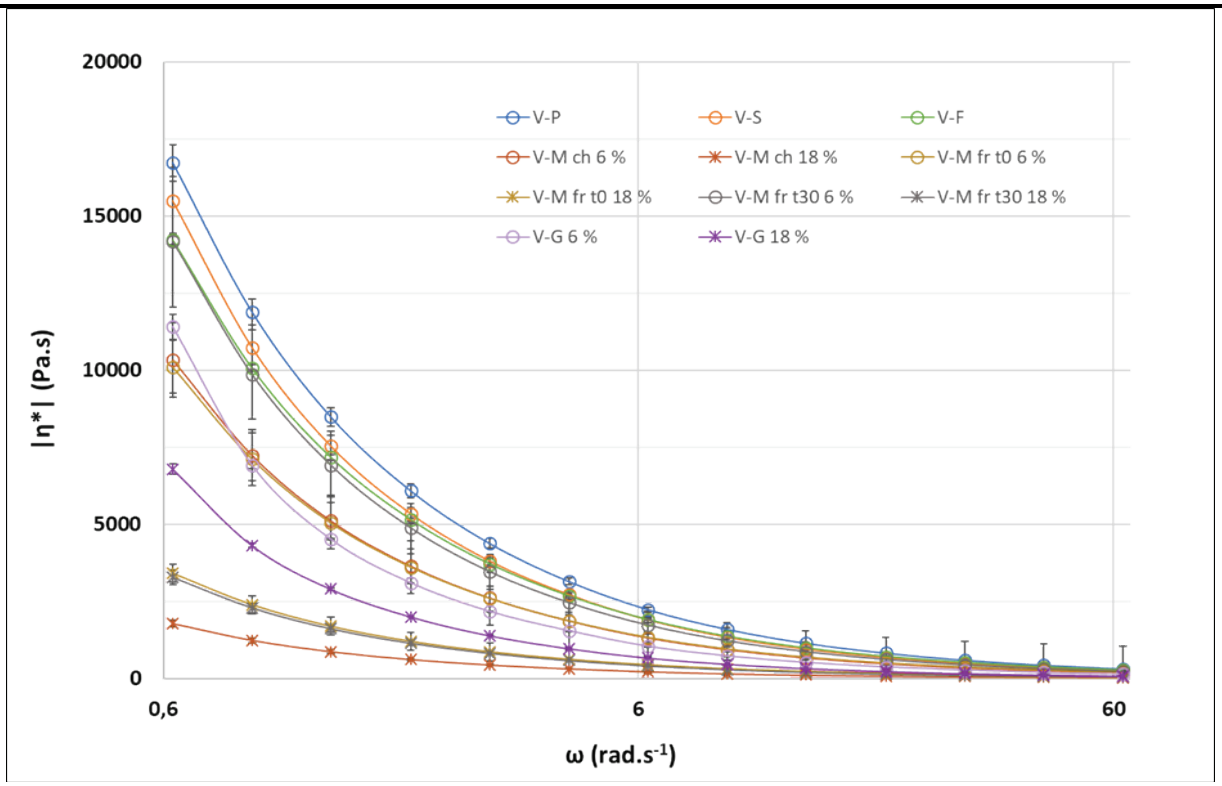


Figure 3.37. *Visualisation du comportement d'amincissement par cisaillement des différentes formulations par représentation de leur viscosité complexe en fonction de la fréquence d'oscillation. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

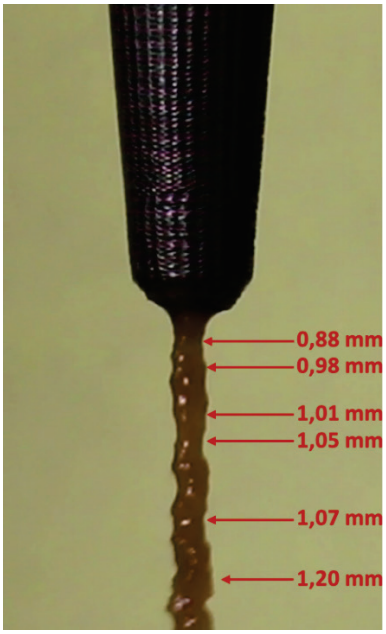


Figure 3.38. *Illustration du phénomène d'amincissement par cisaillement. Capture vidéo de l'écoulement d'une matrice constituée de viande pure à la suite d'une extrusion au travers d'une buse de 0,97 mm de diamètre, à une vitesse de 2,08 mm.min^{-1}. La vidéo a été réalisée avec une caméra Canon EOS 70D (objectif 18/300 réglé à 300 mm), à une fréquence de 25 images par seconde (full HD). L'image présentée a été extraite du film avec le lecteur multimédia VLC 3.0.18 Vetinari.*

3.3.1.2.2.9. Effet de la température sur les modules de conservation de perte (G' et G'')

Le prototype d'imprimante 3D développé dans le **Chapitre 1** permet d'extruder des matrices alimentaires dans une gamme de températures allant de la température ambiante à 60 °C. D'un point de vue pratique, les extrusions ont souvent lieu entre 20 et 30 °C, mais dans certains cas, en fonction des formulations utilisées (présence de biopolymères…), il peut être nécessaire de chauffer davantage. C'est pourquoi un balayage en température a été réalisé, entre 20 et 50 °C, afin d'investiguer l'impact de la température sur les évolutions de comportement rhéologique des différentes formulations. Les **Figure 3.39a** à **Figure 3.39e** représentent l'évolution des modules de conservation et de perte de ces différentes formulations en fonction de la température, pour une déformation fixe située dans la LVR (valeurs indiquées dans le **Tableau 3.10**) et pour une fréquence angulaire (ω) constante de 6,28 rad.s^{-1}. Pour toutes les formulations, G' > G'', ce qui est synonyme d'un comportement de type solide-élastique sur toute la gamme de température analysée. Dans cette gamme de température, les différentes formulations restent donc compatibles avec le procédé d'I3D (Kim et al., 2019 ; Park et al., 2023).

Dans tous les cas étudiés, le module G' augmente en fonction de la température, ce qui signifie que la température peut permettre d'augmenter la résistance et la stabilité structurelle des formulations (Kim et al., 2019). Concrètement, cela peut permettre d'améliorer la conservation de la géométrie 3D après impression, mais cela peut aussi rendre l'extrusion plus difficile avec des risques d'obstruction de la buse.

Quelle que soit la température, une augmentation des modules G' et G'' est observée en présence de farine de lupin (V-F), ce qui dénote un renforcement de la structure et du caractère visqueux. Bien que restant modérées au vu de la concentration très faible en farine (1 %), ces augmentations sont probablement dues à la gélatinisation de l'amidon, qui a permis la réorganisation de ces molécules, conduisant à une structure plus ferme (Duarte et al., 2022).

La viande additionnée de 6 et 18 % de gélatine sont les seules conditions où l'augmentation de G' ralentie, voire s'arrête ; un plateau est atteint à partir de 47 °C dans le cas d'une concentration en gélatine de 18 %. Cependant, aucune décroissance du module G' n'est observée dans la gamme de température étudiée, ce qui aurait été synonyme d'un potentiel défaut d'adhésion entre les couches (Somjid, Panpipat, Cheong & Chaijan, 2022).

Le comportement de la viande pure (V-P) est relativement constant jusqu'à 38 °C, puis une

augmentation rapide du module G' a lieu (**Figure 3.39a-e**). Le module G'', traduisant le comportement visqueux, augmente également, mais avec un décalage d'environ 5 °C. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Park et al. (2023), qui ont mis en évidence une diminution du module G' dès 30 °C. Toutefois, cette différence de comportement peut être expliquée par le fait que la préparation utilisée dans l'étude de Park et al. (2023) n'était pas de la viande pure, mais correspondait à un mélange tamisé à 720 µm de viande de bœuf parée et délipidée, de NaCl (1,5 %) et d'eau (13,5 %). Ces auteurs ont attribué la baisse du module G' à la réticulation des molécules de myosine.

Les modifications du comportement rhéologique des formulations sont principalement dues aux protéines présentes dans la viande. Trois catégories de protéines sont présentes, chacune avec des comportements différents vis-à-vis de la température :

Les protéines sarcoplasmiques (30-34 % des protéines totales) sont solubles dans l'eau. Des observations au niveau cellulaire ont montré qu'elles commençaient à se dénaturer dès 40 °C (Yu, Morton, Clerens & Dyer, 2017). Leur agrégation se produit entre 40 et 60 °C, avec une tendance à la formation d'un gel qui structure et lie les éléments de la viande entre eux ;

Les protéines myofibrillaires (50-55 % des protéines totales), dont la principale représentante est la myosine. Elle possède une température de dénaturation comprise entre 54 et 58 °C (Tornberg, 2005 ; Yu et al., 2017). Cependant, des modifications de la structure secondaire, correspondant à une diminution de la quantité d'hélices-α, apparaissent dès 30 °C (Tornberg, 2005 ; Astruc et al., 2012), voire à partir de 25 °C sur des fibres isolées (Purslow, Oiseth, Hughes & Warner, 2016). Des modifications de l'environnement hydrophobe pouvant affecter les liaisons avec l'eau, conséquence du dépliement de la protéine, ont aussi été mises en évidence à partir de 40 °C (Dominguez-Hernandez, Salaseviciene & Ertbjerg, 2018).

Les protéines du tissu conjonctif (10-15 % des protéines totales). Le collagène, qui représente 90 % des protéines du tissu conjonctif, est la seule à se solubiliser au chauffage à des températures de l'ordre de 65-67 °C (Tornberg, 2005). A noter que le parage préalable des morceaux de viande, avant le broyage, avait pour objectif de retirer le maximum de tissu conjonctif, le tissu conjonctif intramusculaire étant toujours présent.

Sur les **Figure 3.39a** à **Figure 3.39e**, l'augmentation du module G' pour la formulation V-P a bien lieu vers 40 °C et peut donc provenir de la dénaturation des protéines sarcoplasmiques et partiellement de celle des protéines myofibrillaires (myosine), sans qu'il ne soit possible de dire dans

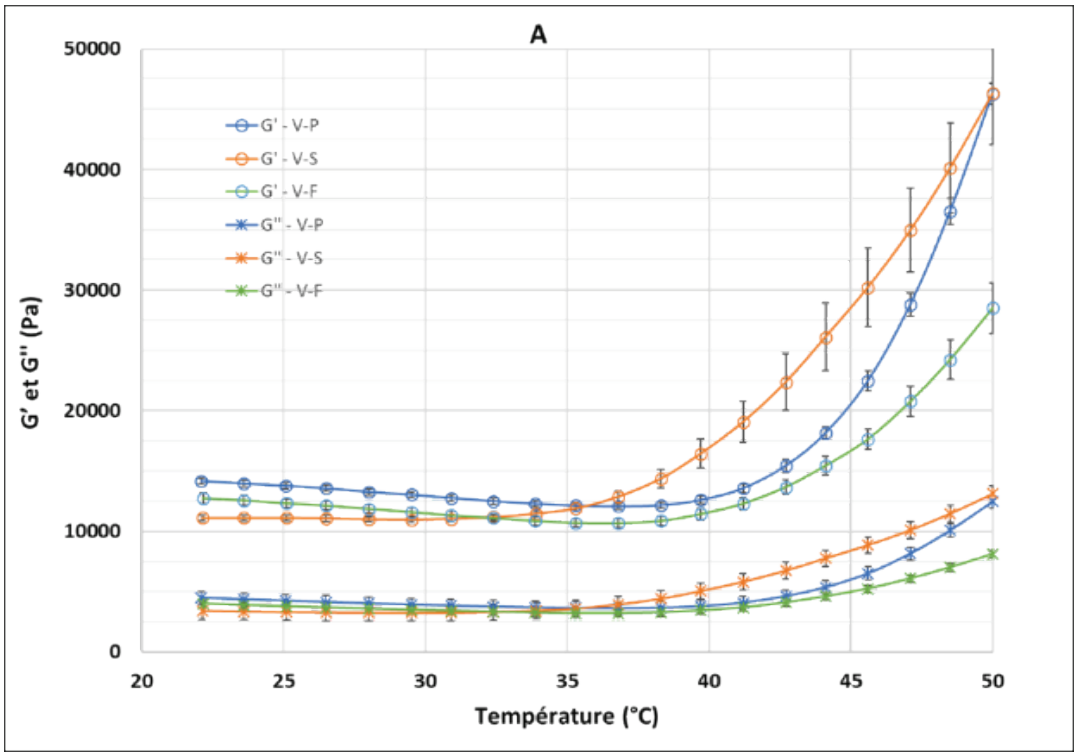
quelle proportion. La présence de mucilage extrait à chaud (V-M ch 6 %) ne semble pas modifier ce comportement. Par contre, une concentration de 18 % freine nettement la vitesse d'augmentation du module G', ainsi que sa valeur maximale, traduisant ainsi une baisse de la résistance de la formulation. Un comportement similaire a été obtenu avec le mucilage extrait à froid (V-M fr t0-30 18 %), mais avec des valeurs du module G' plus basses. Les formulations V-M fr t0-30 6 % ont un comportement intermédiaire. La sonication, destinée à améliorer l'extraction du mucilage des graines de lin, ne semble pas avoir d'effet. Pour toutes les conditions testées, seules les formulations V-S et V-G 18 % ont un module G' qui finit par être supérieur à celui de la viande pure ; V-G 6 % présentant un comportement intermédiaire (**Figure 3.39ae**). A noter que pour la formulation V-S, la valeur du module G' à 50 °C est identique à celle de la formulation V-P, mais l'augmentation du module G' survient dès 30 °C, et ce, à une vitesse plus rapide en présence de sel.

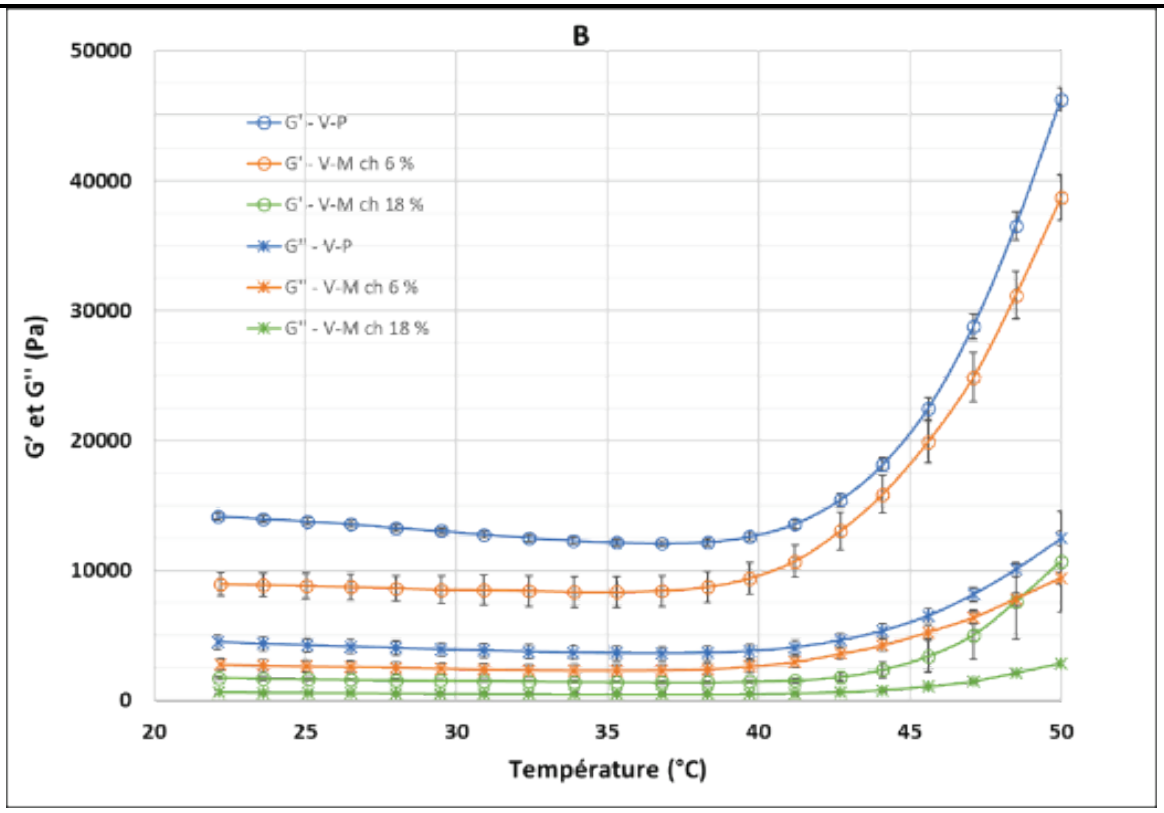
L'ajout de gélatine dans la viande provoque une augmentation nette du module G' à partir de 30 °C, qui dépend de sa concentration (**Figure 3.39e**). A partir de cette température, la fraction de gélatine sous forme visqueuse augmentant, les valeurs du module G'' augmentent et deviennent supérieures à celles de la formulation V-P, dès 34 °C, pour V-G 18 % et, dès 39 °C, pour V-G 6 %. La gélatine, sous cette forme, semble donc améliorer la résistance du mélange, au moins jusqu'à la valeur maximale atteinte à 47 °C pour V-G 6 % et au-delà de 50 °C pour V-G 18 %.

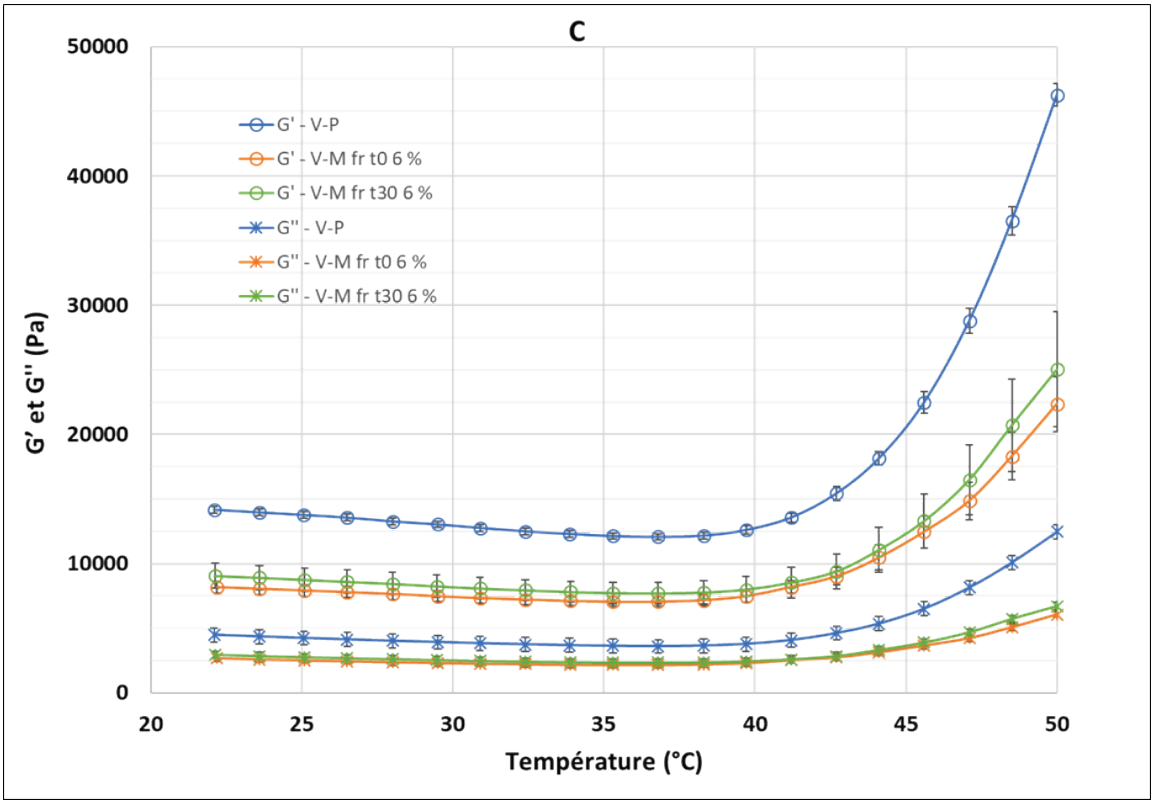
Lors de l'ajout du sel sec dans la viande broyée, celui-ci passe sous forme de saumure du fait de l'eau présente dans la viande qui contribue à le solubiliser rapidement. Le sel provoque ensuite la solubilisation des protéines, notamment celle des protéines myofibrillaires (Offer & Trinick, 1983), puisque les protéines sarcoplasmiques sont déjà solubilisées. A partir de 1,5 % de sel (concentration expérimentale utilisée ici), le sel contribue à la dénaturation macromoléculaire et à la perte en eau de l'échantillon, ce qui peut contribuer à faire évoluer les paramètres rhéologiques. Un phénomène de gonflement, correspondant à une expansion du réseau de filaments provoquée par une augmentation de la force électrostatique répulsive et/ou une diminution de l'une ou de plusieurs forces de contraintes présentes au niveau des bandes M et stries Z, est observé au-delà de 0,1 M de NaCl. Le taux de sel utilisé lors de nos expérimentations étant de 0,26 M, ce phénomène a donc bien eu lieu. Les myofibrilles sont liées entre elles par des protéines de structures au niveau des stries Z et bandes M qui fournissent des contraintes au gonflement. Ces contraintes exercent une force radiale, augmentant la rigidité de la matrice (Offer & Trinick, 1983).

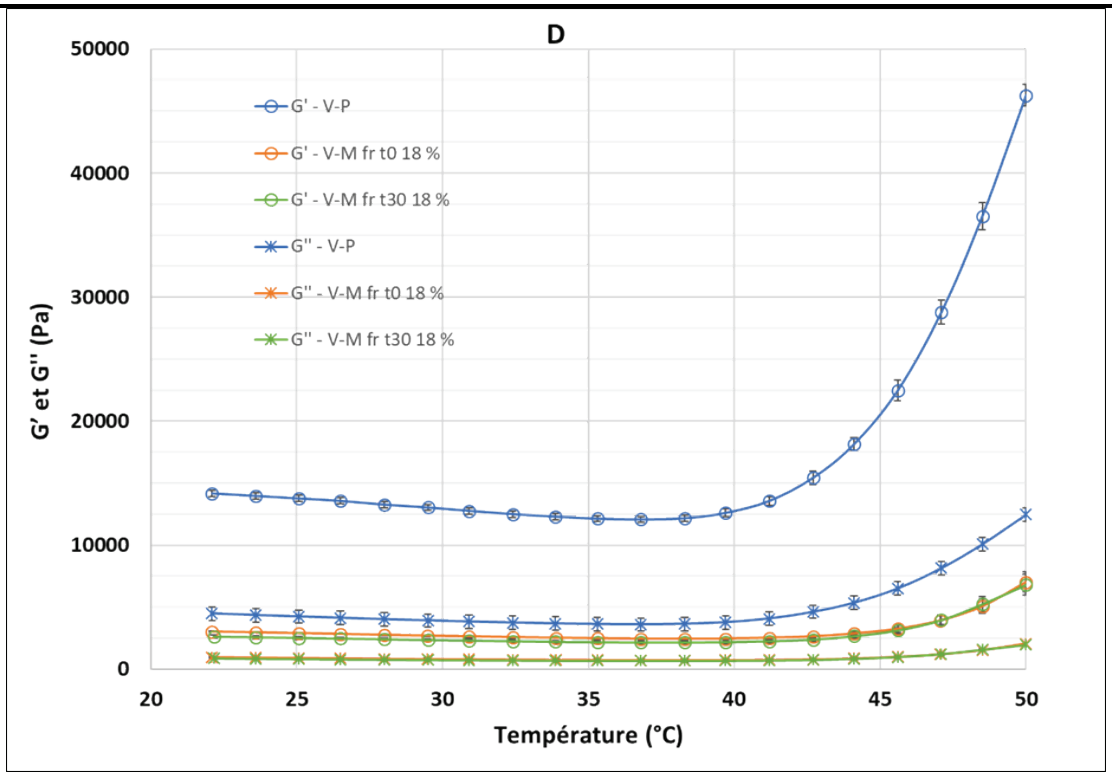
Pour la formulation V-S, deux types de dénaturation ont donc lieu en parallèle : une solubilisation due au NaCl et une dénaturation thermique qui provoque une agrégation des protéines (Tornberg,

2005). Cette double dénaturation peut donc expliquer l'allure de la courbe du module de conservation pour la formulation V-S, notamment entre 37 et 48 °C (**Figure 3.39a**). L'effet température semble néanmoins majoritaire, puisque la viande pure a toujours des valeurs de G' supérieures à celles de la viande salée lors des balayages en déformation à 30 °C (**Figure 3.26**).




B
G' - V-P
G' - V-M ch 6 %
G' - V-M ch 18 %
G'' - V-P
G'' - V-M ch 6 %
G'' - V-M ch 18 %
G' et G'' (Pa)
Température (°C)
0
10000
20000
30000
40000
50000
20
25
30
35
40
45
50


C
G' - V-P
G' - V-M fr t0 6 %
G' - V-M fr t30 6 %
G'' - V-P
G'' - V-M fr t0 6 %
G'' - V-M fr t30 6 %
G' et G'' (Pa)
Température (°C)
0
10000
20000
30000
40000
50000
20
25
30
35
40
45
50



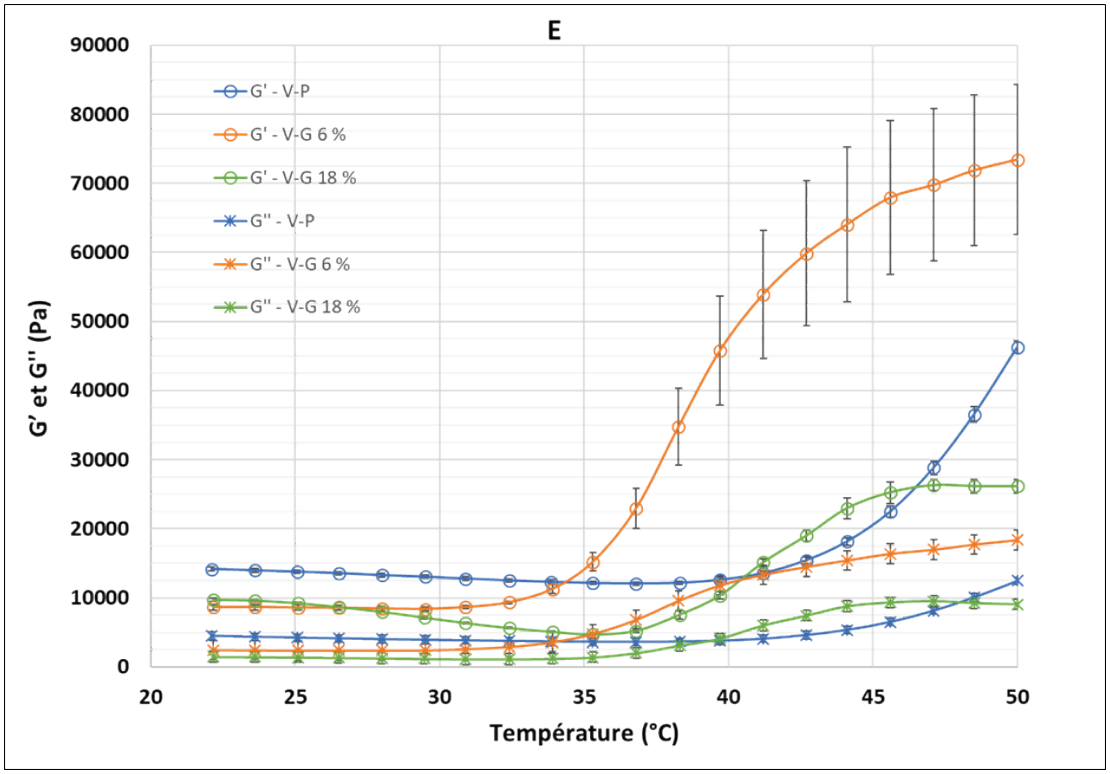


Figure 3.39. *Mesures des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la température, entre 20 °C et 50 °C, avec une augmentation de 2 °C/min : A – Comparaison viande pure (V-P) et viande salée (V-S) ; B – Comparaison viande pure (V-P) et viande + mucilage extrait à chaud 6 % et 18 % (V-M ch 6 % et V-M ch 18 %) ; C – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 6 % de mucilage extrait à froid, sans et avec 30 min de sonication (V-M fr t0 6 % et V-M fr t30 6 %) ; D – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 18 % de mucilage extrait à froid, sans et avec 30 min de sonication (V-M fr t0 18 % et V-M fr t30 18 %) ; E – Comparaison viande pure (V-P) et viande + 6 % et 18 % de gélatine (V-G 6 % et V-G 18 %). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

Au vu des résultats obtenus, les formulations viande pure (V-S), viande salée (V-S) et avec mucilage extrait à chaud (V-M ch 6 et 18 %) ont été retenues pour l'étude en condition d'extrusion correspondant aux caractéristiques de l'imprimante 3D développée dans le **Chapitre 1**. La viande pure constitue notre témoin et, la viande salée a présenté un comportement intéressant. L'apport en sel (en particulier en sodium) doit être réduit pour limiter les risques de développer des maladies cardio-vasculaires, mais en quantité modérée, ses propriétés technologiques (et organoleptiques) pourraient être mises à profit. Une concentration en mucilage de 6 % démontre, pour tous les paramètres rhéologiques étudiés, des performances intermédiaires, éloignées des extrêmes. Ceci peut constituer un avantage dans le cas de formulations plus complexes. Un ajout de 18 % de mucilage constitue ici une condition « extrême », dont les données pourront être utiles pour le développement de modèles prédictifs. De plus, les propriétés du mucilage extrait à chaud semblent plus intéressantes que celles correspondant aux versions extraites à froid. Enfin, le traitement par ultra-sons, qui semble efficace à partir d'une durée de 30 min, complexifie la chaîne de traitement, sans apporter de réelle plus-value.

Les formulations contenant de la gélatine n'ont pas été retenues. Elles présentaient des difficultés d'extrusion dues à une mauvaise homogénéisation de la gélatine, pour une température de 30 °C. Leur utilisation aurait aussi nécessité l'utilisation d'un capteur de force de capacité supérieure à celui utilisé lors de l'ensemble des autres mesures (1 kN vs. 100 N). Par souci d'homogénéité, nous avons décidé de n'utiliser que le capteur de 100 N, ce qui nous a contraint à abandonner les formulations contenant de la gélatine.

3.3.2. Effets de l'extrusion sur les formulations à base de viande sélectionnées

Le cisaillement par extrusion induit des modifications de la structure des lipides et des glucides, de la structure secondaire des protéines et de l'état de liaison de l'eau, ainsi qu'une réduction de la viscosité. Ces phénomènes sont notamment observés pour les polysaccharides non amylacés, comme les mucilages (Avazkhanloo, Shahir, Khalaji & Jafari Anarkooli, 2020).

Le mode opératoire a dû être adapté, pour l'étape d'extrusion assimilée à un traitement par cisaillement (Avazkhanloo et al., 2020), avec le simulateur présenté en section 3.2.1. En effet, une température de 30 °C ne permettait pas l'extrusion de la formulation « viande pure » (V-P). Conformément à ce qui a été énoncé en section 3.3.1.2.2.1, il semblerait qu'une dénaturation, associée à un phénomène d'agrégation, ait eu lieu dès 30 °C, ce qui a entraîné l'obstruction de la buse.

Dans un souci d'homogénéité, les extrusions de toutes les formulations ont dû être réalisées à une température inférieure - 24 °C, soit la température maximale permettant une extrusion de la viande pure. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus à ceux présentés dans les sections 3.3.1.2.1 et 3.3.1.2.2, les mesures au rhéomètre ont été, à nouveau, réalisées à une température de 30 °C. Les résultats des analyses statistiques sont indiqués sous forme de lettres sur les graphiques ; un test de Grubbs, effectué en amont, n'a révélé aucune valeur aberrante pour l'ensemble des paramètres étudiés.

3.3.2.1. La viscosité apparente

Les **Figure 3.40a** à **Figure 3.40d** révèlent des comportements très différents pour les quatre formulations extrudées où le matériau a été soumis à un cisaillement jusqu'à sa déstructuration. Pour la viande pure (V-P), nous constatons un effet de l'extrusion, avec une baisse significative de la viscosité à 1,61 et 2,08 $mm.min^{-1}$ (**Figure 3.40a**). Ceci semble confirmer l'hypothèse formulée en section 3.3.1.2.1, à savoir qu'un taux de cisaillement élevé permettrait de rompre les agrégats particulaires présents dans la viande. Le cisaillement semble donc accentuer la déstructuration de la matrice et peut potentiellement nuire au succès d'une impression 3D. Dans le cas de la viande salée (V-S), l'extrusion n'a pas d'effet significatif sur la viscosité maximale de la préparation, quelle que soit la vitesse. Il est même possible de noter une tendance à la hausse de ce paramètre sur la **Figure 3.40b**. Il apparaîtrait donc que la présence de sel limiterait la rupture des agrégats, probablement du fait de la présence d'interactions faibles. Ces interactions pouvant également être favorisées par une redistribution spatiale des agrégats ou des fragments de fibres musculaires, comme l'ont suggéré Wang et al. (2018) dans le cas du surimi. Ces auteurs avaient en effet évoqué la possibilité d'une redistribution des forces inter- et intramoléculaires, en présence de sel et sous contrainte oscillatoire, au niveau des chaines de méromyosine légère. Comme indiqué en section 3.3.1.2.2, nous avons tenté de mettre ce phénomène en évidence par une approche de marquage immunologique, mais il s'est avéré très difficile d'identifier des marqueurs représentatifs de l'organisation structurelle. Ce point reste donc à éclaircir. Si cette réorganisation spatiale a bien lieu, elle peut également favoriser la formation d'interactions faibles avec le sel par le rapprochement des structures. Ceci pourrait avoir un effet positif sur la structuration de la géométrie après impression, mais cela requiert des analyses complémentaires, notamment par microscopie électronique et dichroïsme circulaire.

L'ajout de 6 % de mucilage a permis d'obtenir un comportement sensiblement équivalent à celui de la viande salée, mais avec, toutefois, une augmentation significative de la viscosité pour une vitesse

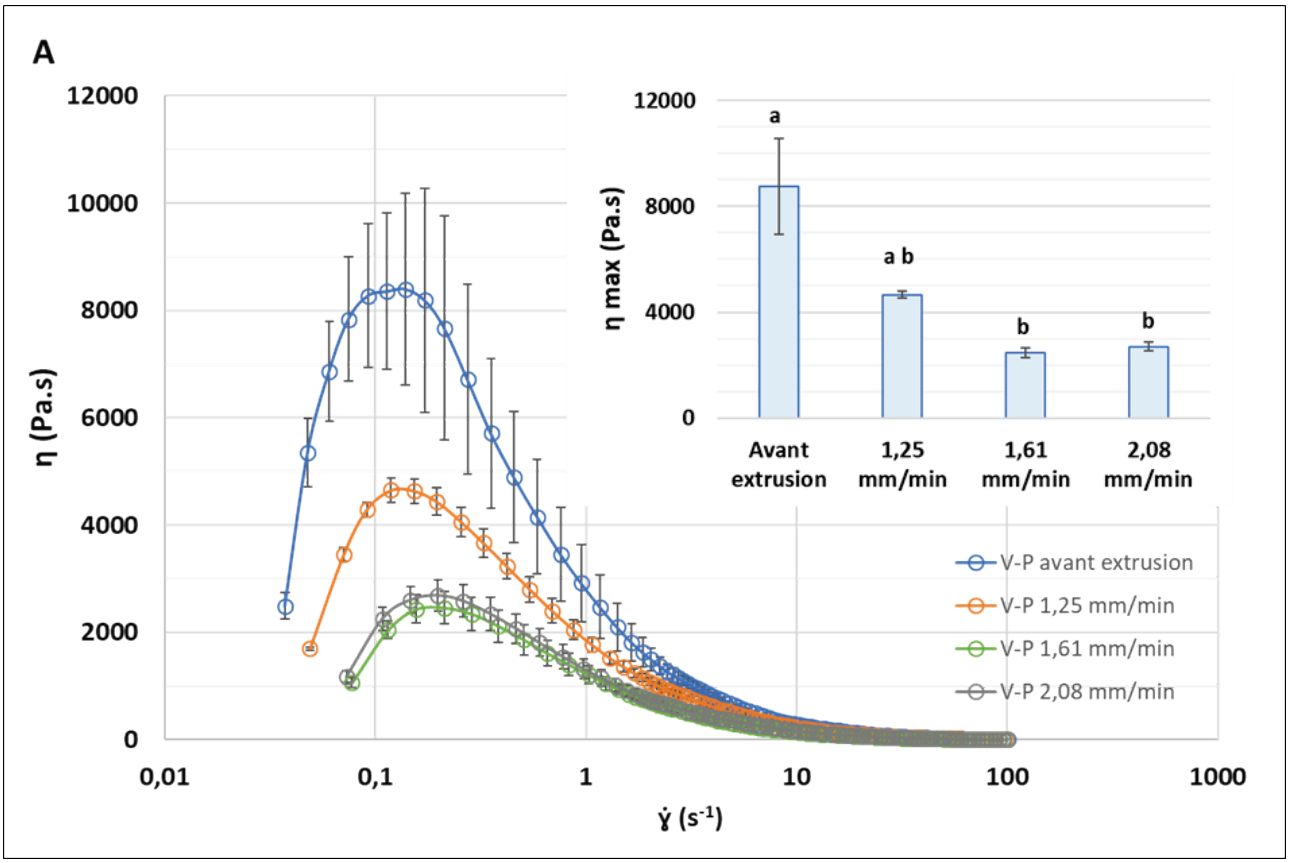
d'extrusion de 1,25 mm.min^{-1} (**Figure 3.40c**). L'augmentation de la viscosité peut être liée à l'étirement et à l'alignement des chaînes de polymères, qui conduisent à la formation de forces intermoléculaires (Etxabide, Kilmartin et al., 2022).

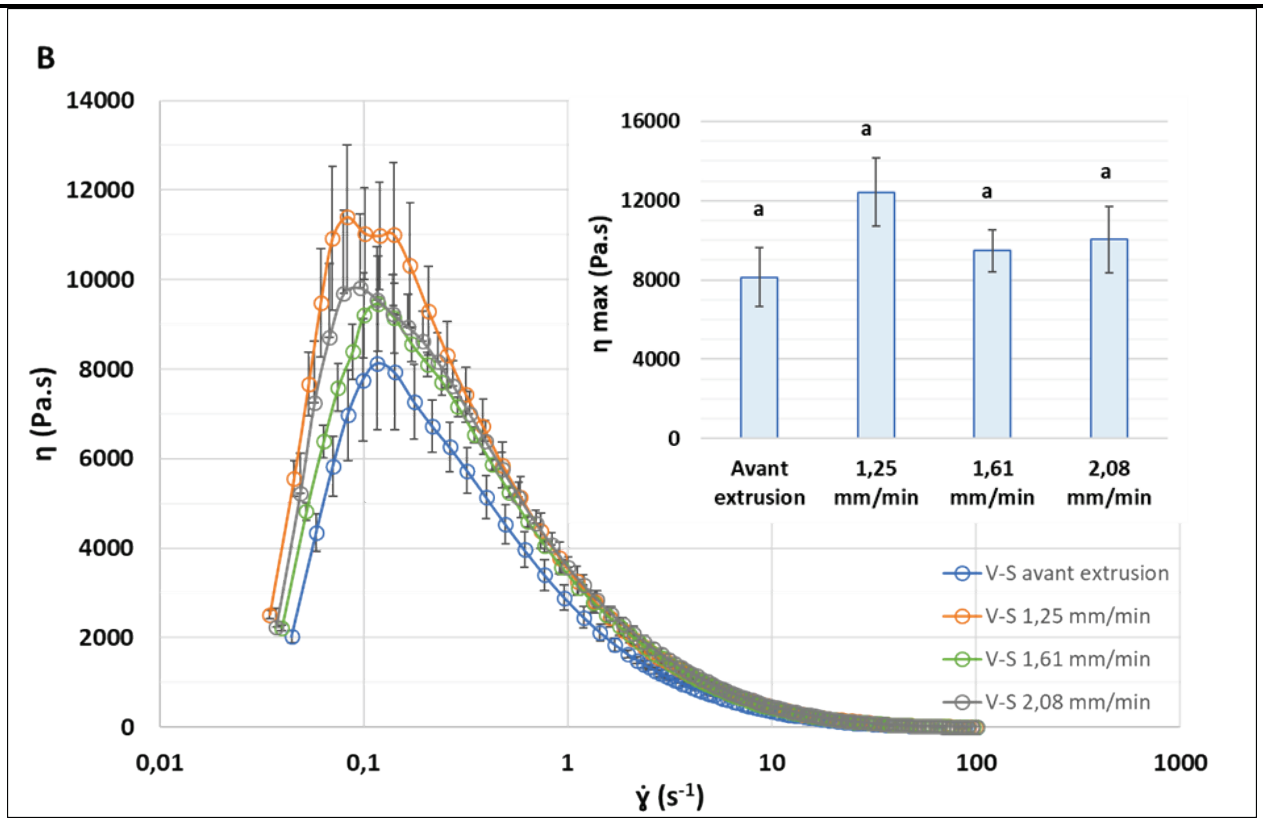
Les résultats concernant le mucilage incorporé à hauteur de 18 % ne montrent pas de différence significative quant à l'extrusion. On notera, néanmoins, une grande hétérogénéité dans les mesures et une viscosité jusqu'à 4 fois inférieure à celle obtenue avec une concentration de 6 %. La teneur en eau affecte donc également la microstructure des formulations, et impacterait la structuration par un réseau de polysaccharides. Lors de l'application d'un cisaillement, le mucilage subit au moins deux types de modifications structurales : 1) au niveau de la structure secondaire des protéines, qui sont présentes à hauteur de 24 % (**Tableau 3.5**) (Avazkhanloo et al., 2020), et 2) une dégradation des polysaccharides (Wu, Li, Wang, Zhou & Mao, 2010).

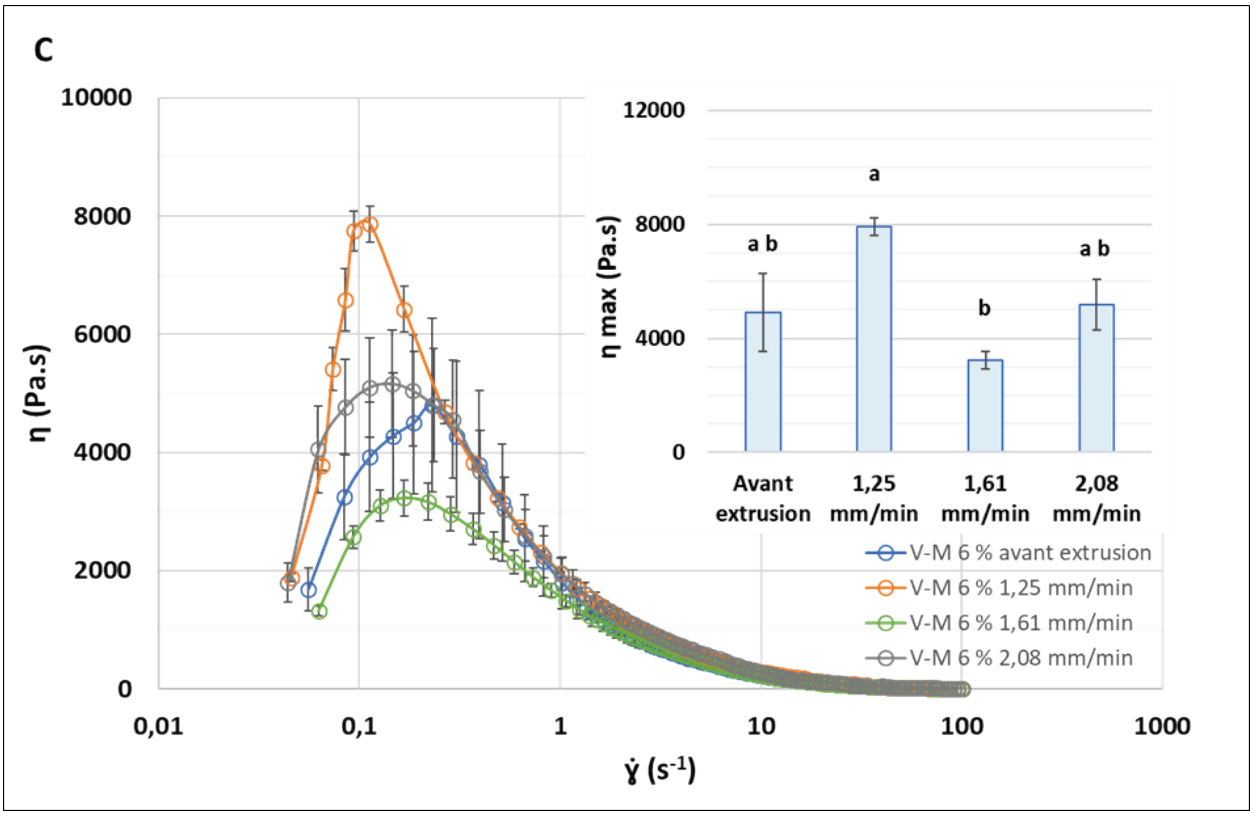
Il semble donc admis, notamment sur la base des travaux de (Wu et al., 2010), que le traitement par extrusion du mucilage de graines de lin dégrade, dans une certaine mesure, la microstructure interne, mais cela reste difficile à quantifier. Cette dégradation entraîne une réduction de la viscosité et une augmentation de la formation de bulles pendant l'extrusion. Elle résulterait de la dégradation des polysaccharides de poids moléculaire élevé en d'autres polysaccharides de poids moléculaire comparativement plus faible ou en monosaccharides, au cours du processus d'extrusion (Wu et al., 2010). Ces constations ne sont pas observées dans notre cas, lorsque du mucilage est ajouté à la viande broyée. Malgré une diminution de la viscosité au cisaillement, les travaux de Wu et al. (2010) ont permis d'observer que l'augmentation de la vitesse d'extrusion entraînait une augmentation de la viscosité. Ce comportement peut être attribué à une force de cisaillement plus importante résultant de la diminution du temps de séjour dans la buse d'extrusion, ce qui a conduit à une dégradation suffisante du mucilage. L'eau agit alors comme un plastifiant, qui peut améliorer le mouvement moléculaire et réduire la torsion et la perte mécanique des chaînes de polymères. Dans notre cas, seule la vitesse d'extrusion la plus basse a permis un accroissement de la viscosité. Cette vitesse de 1,25 mm.min^{-1} peut donc s'apparenter à une vitesse optimale, car elle permet de limiter la dégradation des chaînes de polysaccharides, voire de limiter l'altération de la structure secondaire des protéines (ce dernier point restant à vérifier). Bien que dépendante des ingrédients utilisés, la vitesse d'extrusion semble donc être un paramètre déterminant pour la viscosité finale de la formulation. Des compléments d'analyse par spectroscopie infrarouge permettraient sûrement de répondre à cette question.

Contrairement à la viande pure, l'extrusion a un effet sur les autres formulations, en stabilisant,

voire en augmentant la viscosité apparente. Ceci constitue une alternative intéressante pour améliorer les propriétés de texturation, après I3D, des futurs aliments fonctionnels.




B
η (Pa.s)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
γ̇ (s-1)
η max (Pa.s)
16000
12000
8000
4000
0
a
a
a
a
Avant extrusion
1,25 mm/min
1,61 mm/min
2,08 mm/min
V-S avant extrusion
V-S 1,25 mm/min
V-S 1,61 mm/min
V-S 2,08 mm/min


C
η (Pa.s)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
γ̇ (s-1)
η max (Pa.s)
12000
8000
4000
0
a b
a
b
a b
Avant extrusion
1,25 mm/min
1,61 mm/min
2,08 mm/min
V-M 6 % avant extrusion
V-M 6 % 1,25 mm/min
V-M 6 % 1,61 mm/min
V-M 6 % 2,08 mm/min

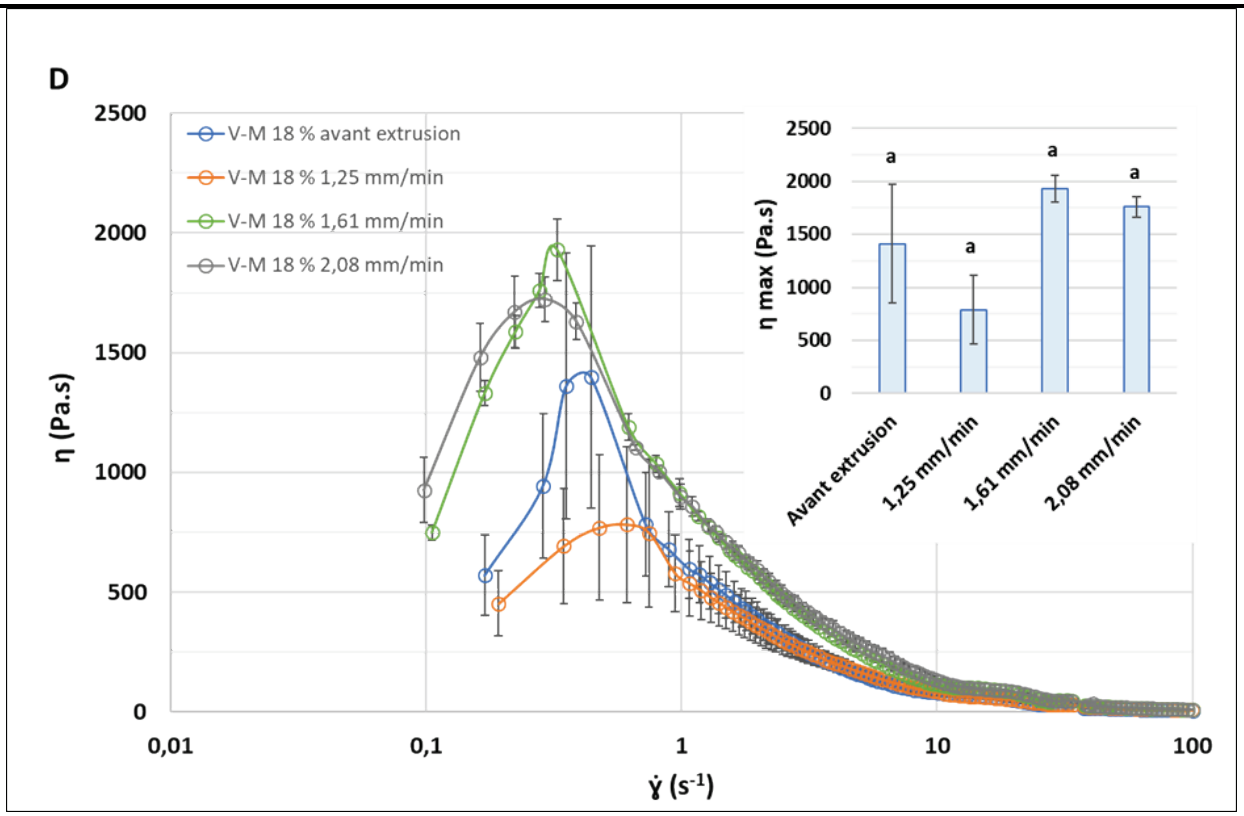


Figure 3.40. *Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 mm.min^{-1} sur la viscosité apparente, en fonction du taux de cisaillement, de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S) ; C – viande + 6 % de mucilage extrait à chaud ; D – viande + 18 % de mucilage extrait à chaud. Les graphiques en histogrammes représentent, pour chaque formulation, les analyses statistiques réalisées sur les viscosités apparentes maximales. Des lettres identiques signifient une absence de différence significative entre les formulations (analyse de variance, test Post-hoc de Tukey, P > 0,05). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.3.2.2. La viscosité complexe

La détermination de la viscosité complexe pour les différentes formulations confirme leur comportement d'amincissement par cisaillement, que ce soit avant ou après extrusion (**Figure 3.41**), confirmant que les particules sont fortement perturbées lorsqu'elles sont soumises à une contrainte de cisaillement (Yang et al., 2019). La viscosité complexe a été calculée à partir du modèle de Cox-Merz (*cf*. 3.1.6.1) lors d'un balayage en fréquence dans la LVR, où l'échantillon n'est pas déstructuré. Dans ce cas de figure, les résultats sont sensiblement différents de ceux obtenus en balayage de déformation (viscosité apparente).

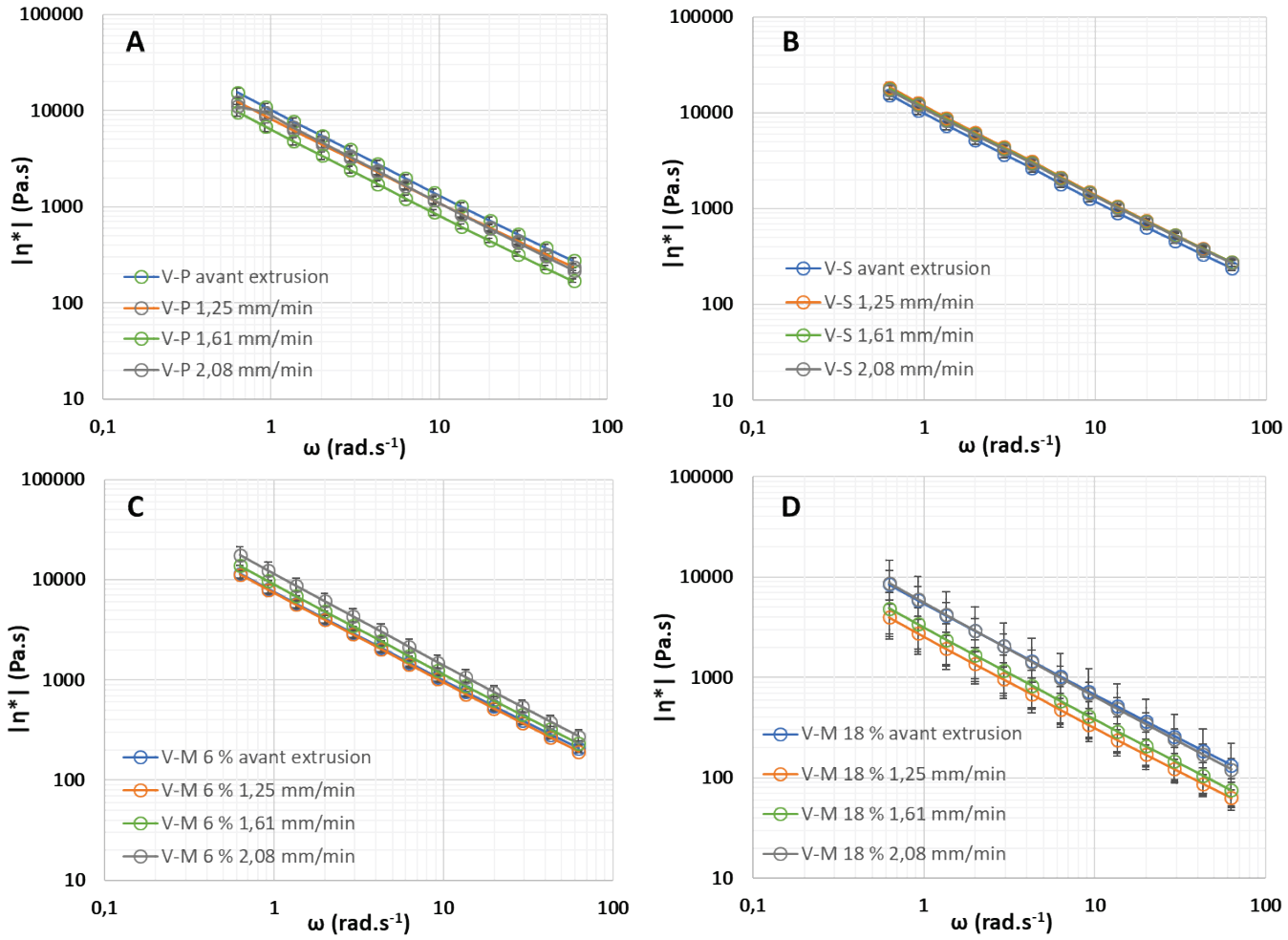


Figure 3.41. *Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D, à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 mm.min^{-1}, sur la viscosité complexe de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S) ; C – viande + 6 % de mucilage extrait à chaud ; D – viande + 18 % de mucilage extrait à chaud. Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

Pour la formulation avec 6 % de mucilage (**Figure 3.41**), l'effet de la vitesse d'extrusion est plus marqué. Une vitesse de 1,25 mm.min^{-1} donne un profil identique à celui de la condition sans extrusion. Il est possible d'observer une tendance à l'augmentation de la viscosité en fonction de la vitesse d'extrusion (**Figure 3.41c**). Cet effet n'est pas présent pour la formulation V-S (**Figure 3.41b**), où les trois vitesses conduisent à des résultats équivalents. Pour V-P, la viscosité diminue, mais de façon maximale à 1,61 mm.min^{-1} (**Figure 3.41a**). Pour V-M 18 % et, comme dans le cas de la viscosité apparente, une hétérogénéité est présente dans les mesures (**Figure 3.41d**) et, l'évolution de la viscosité est inversement proportionnelle à la vitesse. Une vitesse maximale de 2,08 mm.min^{-1} n'a aucun effet sur la viscosité. Comme indiqué précédemment, une vitesse faible comprise entre 1,25 et 1,61 mm.min^{-1} permettrait d'améliorer l'organisation de la structure interne des matrices,

contrairement à une vitesse élevée qui aurait tendance à la déstructurer.

3.3.2.3. Balayage en fréquence

Comme indiqué précédemment, une expérience en balayage de fréquence avec une amplitude de signal fixée et choisie dans la LVR rend compte de la force et du nombre des interactions entre les différents constituants d'une matrice. Une augmentation du module de conservation G' en fonction de la fréquence permet d'obtenir une meilleure structure lors de l'I3D, car une certaine rigidité de la matrice peut être conservée (Kaur et al., 2018 ; Thakur et al., 2023). Une augmentation des valeurs du module G' des différentes formulations est constatée (**Figure 3.42**), aussi bien avant qu'après extrusion. Cependant, un cisaillement plus important, dépendant de la vitesse d'extrusion, permet d'améliorer les valeurs du module G' pour les conditions V-S, V-M 6 % et 18 %. Ceci permettrait de compenser les valeurs de G'max plus faibles obtenues pour les autres formulations, à l'exception de V-P qui, pour rappel, est difficilement imprimable en l'état.

Il est à noter aussi une évolution différente du facteur d'amortissement (tan δ) pour V-S. En effet, une diminution des valeurs a lieu aux basses fréquences, ce qui reflète une perte de cohésion au sein du réseau viande/sel. Les courbes s'inversent ensuite pour les quatre conditions, avec une augmentation de la fréquence (à partir de 4,28 rad.s^{-1}) (Entouré en rouge sur la **Figure 3.42a**). Ceci signifie une régénération rapide des interactions après la perturbation oscillatoire, avec une augmentation du caractère élastique du produit. Ce phénomène n'est pas observé pour la viande pure (**Figure 3.42b**).

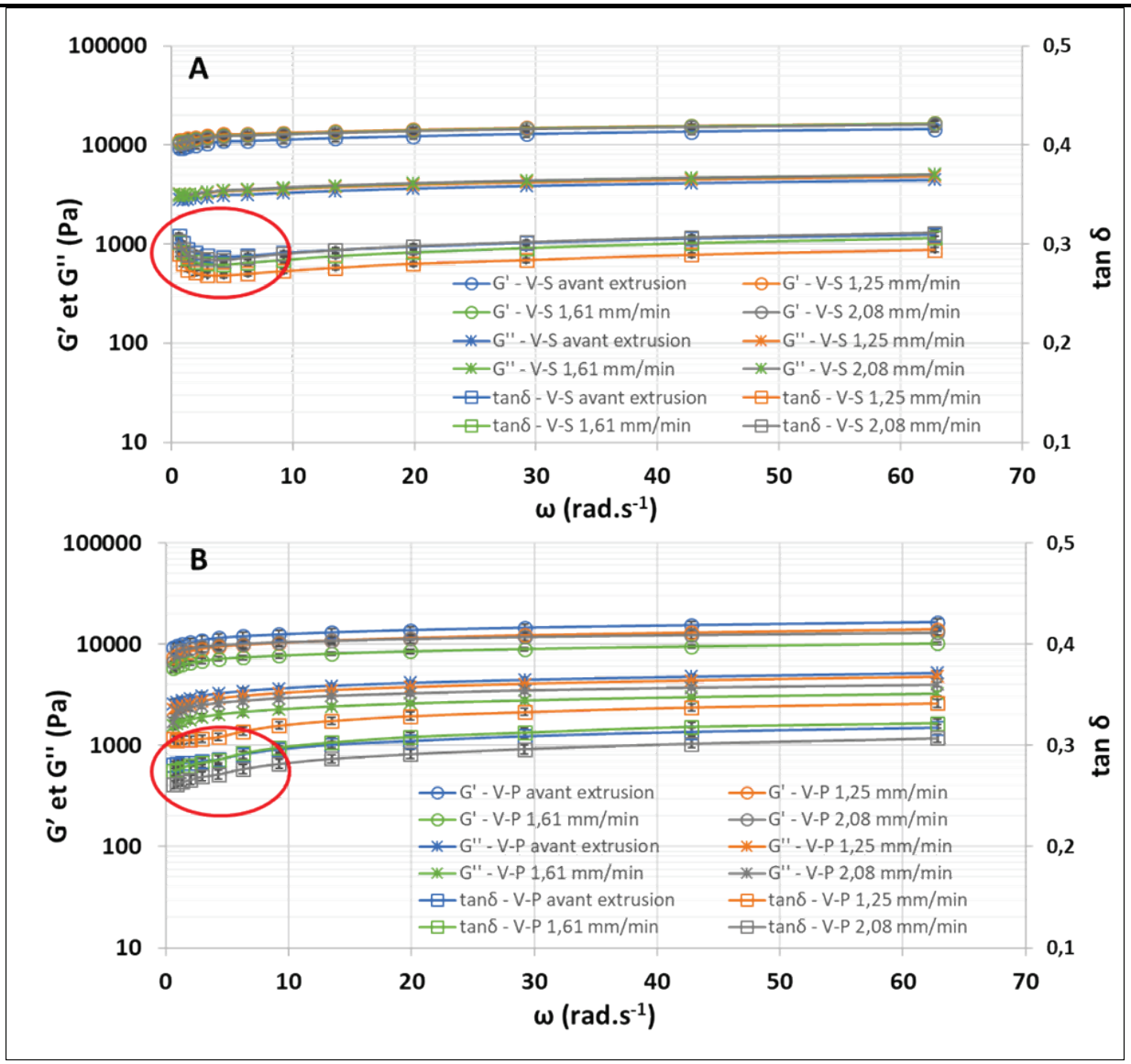


Figure 3.42. *Effet de l'extrusion au travers d'une buse d'impression 3D, à des vitesses de 1,25 ; 1,61 et 2,08 mm.min^{-1}, suite à un balayage en fréquence (0,628 – 62,8 rad.s^{-1}) dans la Région Viscoélastique Linéaire (LVR) de formulations à base de viande : A – viande pure (V-P) ; B – Viande salée (V-S). Les barres d'erreur correspondent aux SEM, calculées à partir de 3 répétitions.*

3.4. Conclusion

D'après les résultats présentés dans ce chapitre, il apparaît que le mucilage extrait à chaud peut être ajouté à une préparation de viande pour en améliorer les propriétés d'imprimabilité. Une concentration à 18 %, malgré une bonne capacité d'extrusion, semble dégrader la capacité de structuration et d'auto-portance de la matrice. Une concentration de 6 % semble constituer une alternative intéressante, au vu du comportement rhéologique intermédiaire de cette formulation, mais également en fonction de l'évolution de sa stabilité structurelle à la température. La mise au

point de formulations plus complexes, contenant notamment du sel peut aussi être envisagée. Malgré les propriétés reconnues de la gélatine pour la facilitation de la mastication et de la déglutition, son ajout dans les conditions de la présente étude entraîne un certain nombre de contraintes d'utilisation, notamment liées à la température.

Le cisaillement provoqué par l'extrusion a pour conséquence une augmentation de la déstructuration de la viande pure, qui peut être limitée par l'ajout de sel. La vitesse d'extrusion est un paramètre important pour la viscosité des formulations extrudées. La formulation de viande et mucilage à 6 % est moins sensible à ce paramètre qu'une formulation en contenant 18 %. Dans ce cas, les résultats présentent une hétérogénéité élevée, avec des valeurs de viscosité très faibles, ce qui peut impacter négativement la conservation de la géométrie imprimée. Au vu des résultats obtenus, la vitesse d'extrusion optimale semble se situer autour de 1,25 $mm.s^{-1}$.

Pour imprimer en 3D un aliment fonctionnel à base de viande, le fait d'ajouter du mucilage (à hauteur de 6 %) et/ou du sel améliore nettement les propriétés rhéologiques, conduisant à une meilleure qualité d'impression par rapport à de la viande pure. En outre, cela peut aussi impacter positivement la sensation en bouche des consommateurs. Ce point reste néanmoins à investiguer par des essais de mastication *in vitro* et *in vivo*, prévus dans le cadre de l'ANS SAMASTIC.

Cette configuration de formulation constitue une première approche et une base de travail permettant, à terme, d'incorporer une quantité donnée de mucilage dans la structure interne poreuse de l'aliment, destinée à agir comme un substitut salivaire. Il reste maintenant à étudier le comportement général de ce type d'aliment fonctionnel. Le recours à une formulation plus complexe, contenant du sel et de la farine dans des proportions adaptées pourra alors être envisagé.

Enfin, l'évolution au cours du temps des différentes formulations (leur vieillissement) n'a pas été prise en compte dans cette étude. Ce type d'analyses complémentaires sera donc à réaliser.

SYNTHESE DU CHAPITRE 3

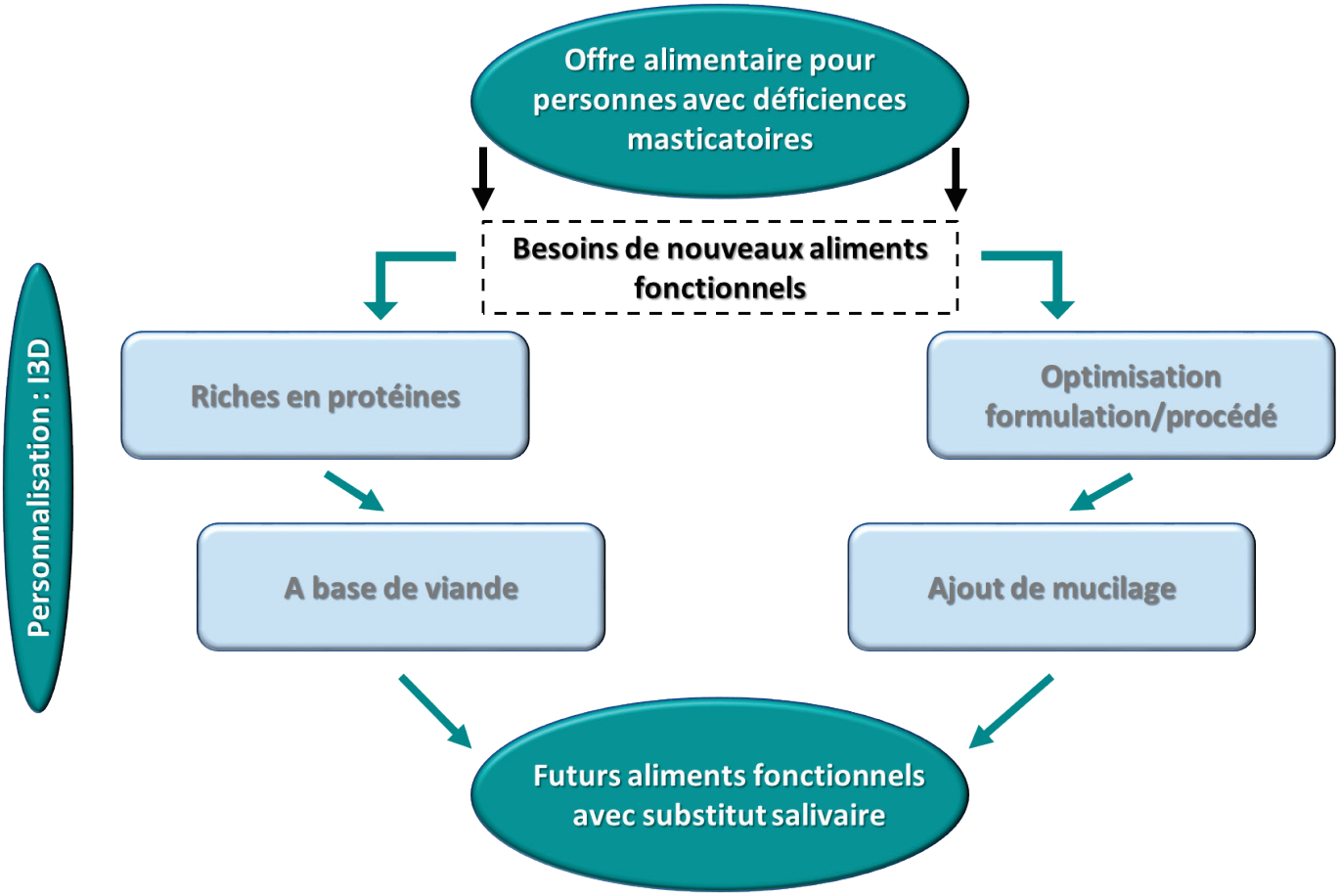


Figure 3.43. *Approche utilisée dans le Chapitre 3 pour la mise au point d'un futur aliment fonctionnel.*

La conception d'un aliment fonctionnel requiert la prise en compte de plusieurs dimensions (**Figure 3.43**). Le choix des matières premières ainsi que celui des procédés de fabrication et de transformation sont primordiaux, mais il est également essentiel de prendre en compte l'avis des consommateurs et/ou des patients. L'acceptabilité sociale du nouvel aliment fonctionnel et de sa méthode de fabrication va conditionner certains paramètres, à la fois dans la conception, mais aussi dans la façon de le présenter et d'en informer les consommateurs. Le **Chapitre 4** de ce mémoire se veut être une première approche afin d'étudier l'acceptabilité sociale par une population cible d'un nouvel aliment fonctionnel imprimé en 3D.

Chapitre 4 :

Une nouvelle approche pour évaluer l'acceptabilité sociale d'une nouvelle technologie et de nouveaux aliments : L'association des « Sciences du Vivant » et des « Sciences Humaines & sociales »

L'acceptabilité sociale traduit un jugement collectif à propos d'une politique ou d'un projet, dont il s'agit de comprendre les fondements et les facteurs d'influence. Si les préférences individuelles peuvent jouer un rôle dans la formation de ce jugement collectif, l'acceptabilité sociale est davantage une question de valeurs et de croyances partagées. L'acceptabilité sociale réfère à une évaluation collective plutôt qu'à des positionnements individuels, au sens où le jugement d'acceptabilité participe des dynamiques sociales susceptibles de le forger et de le transformer. Par ailleurs, ce jugement suppose un élément de comparaison entre le projet proposé et ses alternatives, d'où la définition suivante de l'acceptabilité sociale : « Assentiment de la population à un projet ou à une décision résultant du jugement collectif que ce projet ou cette décision est supérieur aux alternatives connues, incluant le statu quo » (Gendron, 2014).

4.1. Introduction

L'équipe Imagerie & Transferts travaille depuis maintenant près de 4 ans au développement d'aliments fonctionnels par impression 3D alimentaire. Tout au long de cette période, les membres de l'équipe ont été amenés à intervenir auprès de différents publics lors de plusieurs manifestations. Ces échanges ont permis de recueillir un certain nombre d'éléments quant à la perception qu'avaient nos différents interlocuteurs de cette technologie. J'utilise à dessein le terme de perception plutôt que d'acceptabilité, car l'évaluation de cette dernière implique l'utilisation d'outils que nous ne possédons pas et qui sont propres aux Sciences Humaines & Sociales. C'est pourquoi ce dernier chapitre ambitionne de présenter une nouvelle voie de recherche que serait l'association des Sciences du Vivant - au sens large du terme - avec les Sciences Humaines & Sociales. Ce lien a commencé à être tissé au cours de ce travail de thèse. Il s'inscrit dans une volonté de pouvoir transférer, de la façon la plus efficace possible, les travaux du laboratoire vers la société.

Comme il a été montré tout au long de ce mémoire, l'I3D est un outil intéressant pour personnaliser l'alimentation de certaines populations, mais encore faut-il que cette technologie ainsi que les aliments qui en sont issus, soient tolérés, voire acceptés par le plus grand nombre.

Dans ce chapitre, seront présentés quelques résultats préliminaires qui ont permis d'apprécier la réaction de consommateurs potentiels. Cependant, le premier constat qui ressort de ces différents échanges est que l'I3D alimentaire est très largement méconnue. Le manque d'information à son sujet est criant, quelles que soient les tranches d'âges consultées. Ceci s'explique en partie par l'arrivée récente de cette technologie dans le domaine alimentaire, mais également du fait de son image, qui

pour le moment, reste principalement associée à la fabrication d'objets non comestibles.

4.1.1. Faire accepter une technologie ou un aliment innovant, où en sommes-nous ?

Dans ce mémoire, l'I3D alimentaire a été présentée comme un procédé permettant de structurer un aliment à l'échelle macroscopique. Cependant, différentes échelles peuvent être couvertes par l'I3D alimentaire, depuis le niveau cellulaire jusqu'au niveau macroscopique. Au niveau cellulaire, une des voies d'application potentielle est la fabrication de tissu musculaire à partir de la culture de cellules souches. Il s'agit d'une application, certes encore marginale, mais très riche d'enseignements en termes d'acceptabilité. Dans leurs études, Carocho, Morales & Ferreira (2015) et Siegrist & Sutterlin (2017) ont montré que, dans le cas de viande produite à la suite de la culture de cellules déposées par I3D sur un support, les consommateurs étaient à la recherche d'aliments les plus naturels possibles. De ce fait, la production traditionnelle de viande reste mieux perçue que la « viande *in vitro* » ou « viande de synthèse », même si la production de cette dernière est présentée comme étant plus respectueuse de l'environnement et du bien-être animal. Ces travaux soulignent que les consommateurs s'appuient, pour se forger leur propre opinion et évaluer un aliment, sur des informations symboliques et à fort impact (type et code des additifs alimentaires, technologie utilisée…).

Plus récemment, Brunner, Delley & Denkel (2018) ont questionné 2047 personnes à propos de leur ressenti en matière d'I3D alimentaire en fonction du niveau d'information reçu. Ils ont constaté que les connaissances de cette technologie étaient variables, mais globalement faibles (2,33/6 sur l'échelle de Likert qui permet d'évaluer une attitude chez un individu). Néanmoins, ces auteurs ont pu tester l'effet positif d'ajouter des informations ciblées à l'attention des consommateurs, comme le fait que la technologie pourrait les aider dans la préparation de repas sains et personnalisés, tout en introduisant une dimension ludique. Ces auteurs affirment avoir ainsi pu vaincre le phénomène de néophobie. Ceci confirme les travaux de (Lupton, 2017) qui indique que, pour être accepté, une nouvelle technologie ou un nouvel aliment doit convaincre les consommateurs de son potentiel et de sa valeur, tout en les rassurant. Cependant, selon Moerbeek & Casimir (2005), le postulat de départ qui consiste à dire qu'une meilleure connaissance conduit à une plus grande acceptation est très dépendant de l'aliment concerné. En étudiant l'acceptabilité d'aliments issus du génie génétique et dont les effets sur l'organisme ne pourraient être visibles qu'à très long terme, ces auteurs ont montré

que le consommateur bien informé sur le contexte, était susceptible d'être préoccupé par le manque de connaissances ; ce phénomène est qualifié de « paradoxe de l'information ». Pour l'heure, nombre d'études sur l'I3D d'aliments carnés utilisent des additifs pour modifier leur texture afin de les rendre imprimables (Hamilton, Alici & in het Panhuis, 2018). L'utilisation de ces molécules constitue un frein supplémentaire à l'acceptabilité sociale du nouvel aliment, où, à la néophobie en lien avec la technologie, va s'ajouter le concept d'ultra-transformation (ensemble de transformations physiques, chimiques ou biologiques obtenues par des procédés industriels). Evans, de Challemaison & Cox (2010) ont d'ailleurs mis en évidence que les consommateurs étaient plus réticents aux modifications chimiques d'un aliment qu'aux modifications physiques. Or, à ce jour, et dans la grande majorité des cas, l'I3D alimentaire de produits carnés cumule ces deux types de transformation.

Comme il a été montré dans les chapitres précédents, notre choix a été de proscrire l'utilisation d'additifs texturants pour la conception d'aliments fonctionnels. Pour ce faire, le procédé a, tout d'abord, été optimisé et adapté au type de matrice alimentaire. Cela a fait l'objet de la première étude menée au sein du laboratoire pour concevoir la nouvelle imprimante 3D alimentaire (Portanguen et al., 2022 – **Chapitre 1**). Cette approche d'optimisation du procédé d'impression pourrait être de nature à rassurer les futurs consommateurs. D'ailleurs, (Lupton & Turner, 2016) ont déjà mis cet argument en avant, en indiquant que le développement des technologies 3D en alimentaire ne se fera qu'à condition de conserver un côté « naturel » aux aliments. Cette vision permettant aux consommateurs de préserver le côté affectif associé à la nourriture et de passer outre l'aspect transgressif de la technologie.

En plus du développement de l'imprimante 3D, nous avons aussi travaillé sur la formulation de l'aliment et sur les propriétés intrinsèques des différents ingrédients. Comme cela a été retranscrit dans le **Chapitre 3**, plusieurs critères doivent alors être quantifiés : les propriétés mécaniques (viscosité, comportement au cisaillement), les effets sur la texture de l'aliment et les propriétés nutritionnelles, mais également les caractéristiques organoleptiques qui restent à optimiser.

Comme nous l'avons vu au **Chapitre 2**, une voie de texturation novatrice possible, qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'additifs texturants, est d'utiliser la réaction de glycation. Cette réaction, qui permet d'établir des liaisons covalentes entre des macromolécules, est délicate à contrôler, notamment dans le cas de la gélatine, mais elle reste à étudier dans le cas d'une matrice viande. Malgré son caractère naturel (car présente dans tous les aliments cuits et se produisant aussi dans le corps humain), cette réaction pose question du point de vue de l'acceptabilité sociale car elle peut être associée, dans l'imaginaire collectif, à une ultra-transformation de l'aliment. Le scientifique se

trouve alors devant le dilemme suivant : doit-il être totalement transparent et expliquer comment a été conçu l'aliment, ou peut-il se contenter de dire qu'un ingrédient connu, tel que du sucre, a été ajouté ? Le niveau d'information est primordial et va probablement conditionner la réaction du consommateur. En effet, en fonction du niveau de connaissances scientifiques de ce dernier, le fait que le scientifique lui parle de « molécules » ou de « liaisons covalentes » peut induire chez lui une crainte, potentiellement source de blocage.

L'application qui semble être la plus importante concernant l'I3D alimentaire, à savoir la personnalisation de l'alimentation (Lupton & Turner, 2016 ; citée également dans Portanguen et al., 2019), pourrait contribuer à faire accepter plus facilement cette technologie auprès des populations. En effet, si la perception des aliments imprimés est orientée sur des aspects nutritionnels/santé, ou sur la lutte contre la malnutrition, alors cette technologie pourrait constituer, aux yeux du consommateur, un atout et non plus un frein à la consommation de ce type de produits. Les marchés de niches, la gestion des ressources naturelles, la sécurité alimentaire ou la créativité culinaire sont autant de facteurs qui permettront à ce type de procédé d'être parfaitement adopté. L'I3D alimentaire pourrait, dans un avenir proche, avoir toute sa place en tant que nouveau procédé et, ne serait pas plus révolutionnaire, dans la conscience collective, que l'utilisation du four à micro-ondes à son époque. Même si, selon Brunner et al. (2018), le fait d'émettre des points de comparaison entre une nouvelle et une ancienne technologie ne suffit pas à faire tomber les réticences concernant la nouvelle, une néophobie persistante, voire renforcée, pourrait être observée chez certaines personnes.

Même si, dans ce travail de thèse, la conception d'aliments fonctionnels a été orientée vers des populations âgées ou en situation de handicap, les jeunes générations constituent une cible de choix pour cette technologie émergente. La génération « Z » (personnes nées à partir de 2000), rien qu'en France, représentera à l'horizon 2025-2030, 75 % des actifs. Cette génération va bouleverser les habitudes alimentaires que nous connaissons actuellement du fait de l'utilisation d'outils numériques, de plus en plus présents. La livraison à domicile à toute heure, l'influence des réseaux sociaux sur la façon de consommer, ainsi que le suivi de son alimentation au travers d'applications dédiées, feront émerger de nouvelles façons de se nourrir, où l'I3D pourrait parfaitement trouver sa place. D'ailleurs, selon plusieurs études, 50 % des 18-24 ans sont prêts à utiliser une imprimante 3D alimentaire dans un futur proche (The NPD Groupe, 2017 ; Kantar TNS, 2017). Selon The Nielsen Company (2015), quatre catégories de « Millenniaux[30] » (personnes nées entre 1980 et 2000, appelées aussi génération

[30] *Millennials* en anglais.

« Y ») se côtoient : 1) des consommateurs soucieux de l'environnement et de l'impact environnemental de l'alimentation, 2) des personnes attirées par les nouvelles technologies, 3) des personnes soucieuses de leur pouvoir d'achat, et enfin, 4) des personnes sensibles aux innovations, mais souhaitant conserver certaines valeurs traditionnelles. Ce sont toutes ces sensibilités que les chercheurs et ingénieurs doivent prendre en compte pour développer l'I3D alimentaire et concevoir les futurs aliments imprimés.

Une autre catégorie de personnes, cette fois multigénérationnelle, influence, depuis quelques années, la façon de consommer, en particulier celle des produits carnés : ce sont les adeptes du flexitarisme, un mode de vie où la consommation de produits carnés est modérée, voire fortement réduite, mais encore présente dans l'alimentation. Alors que les végétariens représentent environ 1,7 % de la population française et les végétaliens 0,5 %, les flexitariens représentent 34 % des foyers, avec 19 % des flexitariens ayant moins de 35 ans (Kantar Worldpanel, 2016). Cette population convaincue des problématiques écologiques actuelles pourrait être tout à fait sensible à des arguments relatifs à la valorisation de produits ou de coproduits de l'industrie de la viande, actuellement peu valorisés, de façon à limiter les pertes et gaspillages. Ces coproduits (par exemple des morceaux riches en collagène, les abats, *etc*.), qui sont riches en nutriments d'intérêt pour la santé humaine, pourraient être valorisés grâce à l'I3D alimentaire (Schiell et al., 2023).

4.1.2. L'aliment fonctionnel, une vraie plus-value en termes d'acceptabilité ?

La réaction du consommateur peut également être orientée par l'utilisation qu'il va faire de l'aliment. Lorsque nous parlons d'aliment fonctionnel, il est sous-entendu que le consommateur en retirera une plus-value. Cependant, la consommation de ce type d'aliments reste, malgré tout, très peu étudiée. Citons néanmoins Korsen-Bohr & O'Doherty Jensen (2006) qui ont rapporté qu'une population pouvait être, finalement, très réticente au fait de consommer un aliment susceptible de prévenir les maladies cardiaques. Dans cette étude, la place ambiguë de l'aliment, à la frontière de l'alimentation et de la médecine, était difficile à percevoir pour les patients. Néanmoins, il semble que les réserves qui pouvaient être émises par les consommateurs-patients puissent être levées, à condition que les trois axes suivants, favorisant l'acceptabilité sociale des aliments fonctionnels, soit satisfaits (Conroy, Gan, Errmann & Young, 2021) : 1) la santé autogérée à l'aide de ces aliments, 2) l'établissement de la confiance par le partage des connaissances et de l'information, et 3)

l'importance de l'heuristique des aliments fonctionnels afin qu'ils soient considérés comme un symbole culturel de la mise en œuvre de son propre bien-être. Même si la littérature scientifique liée à la conception d'aliments fonctionnels à tendance à s'enrichir, y compris celle concernant les applications en lien avec l'I3D, les études existantes traitent rarement de l'acceptabilité sociale de ces nouveaux aliments. Par exemple, dans les travaux de Kewuyemi, Kesa & Adebo (2021), les aspects technologiques et commerciaux sont étudiés de façon approfondie, alors que l'acceptabilité de l'aliment et le ressenti du consommateur ne sont abordés que de façon superficielle. En réfléchissant à la meilleure manière de concevoir un aliment fonctionnel à base de coproduits issus de l'industrie alimentaire, Tkaczewska et al. (2021) ont mis en évidence trois aspects à privilégier pour que l'aliment créé soit accepté par les consommateurs ciblés : 1) utiliser l'empathie du consommateur/utilisateur, ce qui implique que le concepteur le connaisse parfaitement et donc s'immisce dans sa vie, 2) visualiser et procéder à un prototypage rapide de l'aliment, ce qui implique de créer des modèles et, si possible, les premières versions des prototypes, de façon à obtenir rapidement des informations sur les forces et faiblesses du produit ; et 3) favoriser, auprès des consommateurs, la collaboration entre acteurs de la formation venant de disciplines différentes (par exemple, les Sciences Humaines & Sociales et les Sciences du Vivant). A l'image des informations issues de la littérature évoquées *supra*, Baker, Lu, Parrella & Leggette (2022) ont souligné l'incohérence des résultats publiés. En effet, à partir d'une méta-analyse basée sur 1050 études, ces auteurs indiquent que la plupart des participants avaient de faibles connaissances quant à la consommation d'aliments fonctionnels, en particulier sur le plan nutritionnel et, qu'ils n'étaient généralement pas familiarisés avec ce concept. Les résultats de cette méta-analyse montrent qu'il est important d'améliorer les connaissances des consommateurs en matière d'aliments fonctionnels pour favoriser leur acceptabilité.

Le **Chapitre 3** du présent mémoire s'est attaché à présenter la conception d'un aliment fonctionnel sous l'angle de sa formulation, notamment en intégrant un substitut salivaire d'origine végétale. L'intégration de mucilage issu de graines de lin directement dans un aliment via l'I3D, constitue une approche innovante en soi, dont l'objectif est de faciliter l'ingestion de cet aliment. Or, en fonction des conditions d'extraction, le mucilage peut avoir une consistance proche de la salive humaine ou du mucus. Malgré la saveur neutre de cet extrait végétal, l'ingérer pur, qui serait une méthode également efficace, pose un gros problème d'acceptabilité, ce qui fait qu'il est très souvent rejeté par le consommateur/utilisateur. Intégrer ce substitut directement dans l'aliment lui confèrerait alors une nouvelle fonctionnalité, en permettant qu'il soit plus facilement ingéré. Les avantages de l'incorporation de mucilage dans un aliment en utilisant l'I3D seraient réels et devraient améliorer

efficacement la mastication, en permettant un contrôle et une libération de quantités adéquates de mucilage dans la cavité buccale et, en masquant dans l'aliment la consistance de ce substitut salivaire. Toutefois, outre les aspects techniques, cela implique aussi de s'intéresser aux aspects hédoniques : quelle sera la sensation en bouche ? Sera-t-elle agréable ou suscitera-t-elle aussi un phénomène de rejet ? Encore une fois, les informations transmises aux consommateurs seront primordiales et c'est là où le rôle du scientifique du domaine des Sciences du Vivant atteint ses limites et où celui du sociologue devient essentiel. En effet, dans la plupart des études, les scientifiques n'incluent pas le rôle de la technologie dans le processus de décision et, circonscrivent les critères d'acceptabilité aux seuls aspects organoleptiques (goût, couleur, *etc*.). Une démarche de sciences participatives ou de type recherche-action apparaît comme un élément indispensable pour finaliser la conception d'un nouvel aliment.

4.2. Les méthodes de travail

Ce travail n'a pas la prétention d'être une étude sociologique, mais se veut plutôt une présentation et une mise à profit d'un ensemble de données recueillies au cours de ces 4 dernières années.

Le contact avec le public est un élément essentiel qui permet de connaître les attentes et les freins éventuels. La première méthode envisagée a consisté à interroger un public naïf, sans information préalable. L'I3D alimentaire étant très peu connue, cette technologie a rapidement montré ses limites, le public étant demandeur d'informations.

L'angle sous lequel est abordé le discours explicatif est important. Le parti pris dans cette étude a été de présenter l'I3D alimentaire, d'abord, comme une aide au mieux vivre à destination des personnes âgées ou en situation de handicap, en mettant volontairement les aspects ludiques de la technologie au second plan. Un autre point a été systématiquement mis en avant, l'adaptation du procédé à l'aliment et non l'inverse, donc la non-utilisation d'additifs texturants.

Depuis 2019, quatre évènements ont permis de recueillir des données quantitatives ou qualitatives en lien avec l'acceptabilité de l'I3D alimentaire :

- Mai 2019 : 167 personnes interrogées via un questionnaire (**Annexe S 4.1**) lors de journées portes ouvertes organisées sur le site de Theix du Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-

Alpes. Il s'agissait de présenter l'I3D et l'I3D alimentaire à un large public allant d'enfants en milieu scolaire à des personnes actives ou retraitées ;

- Novembre 2022 : Présentation et démonstration de l'I3D alimentaire auprès d'un panel de personnes de plus de 55 ans lors de la Semaine Nationale de la Dénutrition (Chamalières, 63). Un partenariat a été mis en place avec l'unité TransitionS (Université Côte d'Azur) pour cette séance. Les consommateurs ont signé une autorisation de droit à l'image et ont accepté d'être filmés afin de pouvoir analyser leur rapport d'étonnement[31]. Les résultats sont en cours d'analyse au sein de l'unité TransitionS ;
- Février 2023 : L'équipe Imagerie & Transferts a eu l'opportunité de présenter ses travaux et de réaliser une animation autour de l'I3D alimentaire lors du Salon International de l'Agriculture (Paris). Un second questionnaire a été préparé, toujours en partenariat avec l'unité TransitionS, afin de recueillir les impressions du public (**Annexe S 4.1**) ;
- Avril 2023 : L'équipe Imagerie & Transferts a été sollicitée pour présenter l'I3D alimentaire lors d'une séance « découverte » organisée au profit des membres de l'association « Les Gourmets Curieux ». Une présentation vulgarisée de nos travaux, d'une durée de 45 minutes, a été effectuée, suivie d'une démonstration/dégustation d'aliments imprimés. Le public concerné avait la possibilité de remplir le questionnaire (identique à celui présenté au SIA), en début de séance, puis de le compléter au cours de la présentation. Les consommateurs ont signé une autorisation de droit à l'image et ont accepté d'être filmés afin de pouvoir analyser leur rapport d'étonnement. Les résultats sont en cours d'analyse au sein de l'unité TransitionS.

4.3. Résultats obtenus

4.3.1. Journées portes ouvertes Centre INRAE – Mai 2019

Cette première prise de contact remonte aux prémices de l'étude de l'I3D alimentaire au sein de l'unité QuaPA. Cette discipline en était encore à ses balbutiements au niveau mondial et, à notre connaissance, aucun média grand public ou de vulgarisation n'avait commencé à aborder le sujet en France.

Concernant les résultats en lien avec ce premier évènement, autant la **Figure 4.1bc** montre que

[31] Ou « note d'observation critique », consiste à apporter un regard extérieur sur une situation donnée.

l'I3D, en tant que méthode fabrication d'objets, était connue du grand public, avec des disparités en fonction de l'âge (**Tableau 4.1**), autant l'I3D alimentaire était méconnue de la majorité des participants à cette enquête. Malgré cette méconnaissance due à un manque évident d'informations, plus d'un tiers des personnes interrogées étaient prêtes à consommer des aliments imprimés, cette proportion s'élevant même à 85 % si l'aliment en question pouvait contribuer à améliorer leur état de santé (**Figure 4.1e**). Ceci rejoint les observations de Gayler, Sas & Kalnikaité (2018) qui ont mis en évidence la place « non domestique » de l'I3D alimentaire, sous-entendu que cette technologie doit être utilisée dans un cadre bien précis, comme le « médical » dans notre cas. D'après ces auteurs, l'effet à long terme des denrées produites étant une source d'inquiétudes, une stricte utilisation à des fins « médicales » pourrait alors permettre de lever ces inquiétudes, mais également de permettre une meilleure diffusion du potentiel de l'I3D auprès des utilisateurs.

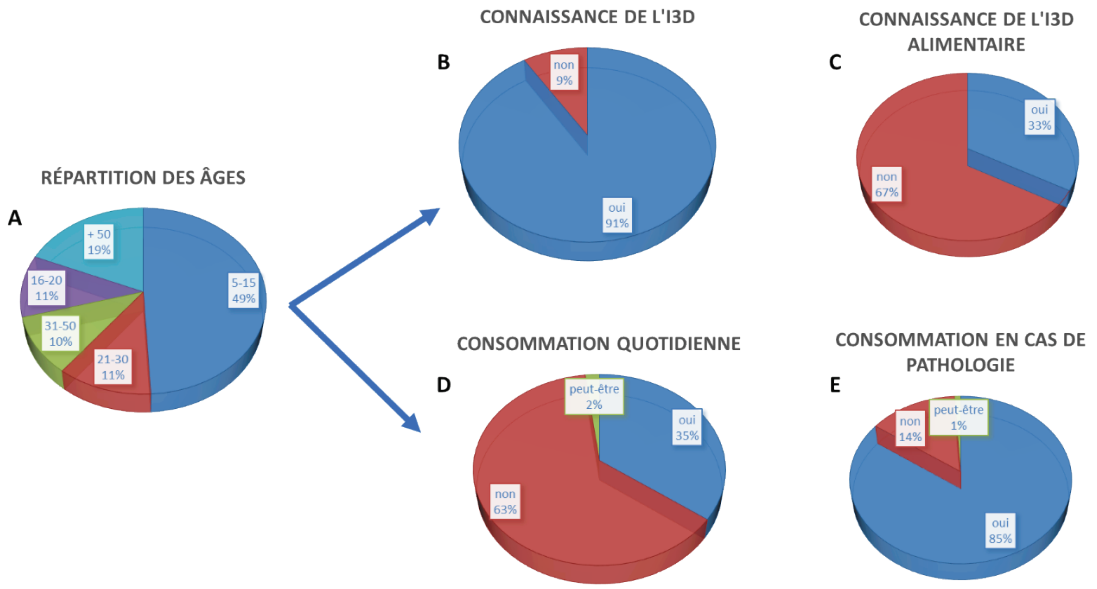


Figure 4.1. *Evaluation de la connaissance de l'I3D sur un panel de 167 personnes, de tous âges. A – Répartition des personnes interrogées par tranche d'âge ; B – Connaissance de l'I3D en général ; C – Connaissance de l'I3D alimentaire ; D – Acceptation pour une consommation quotidienne d'aliments imprimés ; E – Acceptation pour une consommation en cas de pathologie.*

Tableau 4.1. *Evaluation de la connaissance de l'I3D et de l'I3D alimentaire par tranche d'âge (n=167).*

	5-15 ans (%)			16-20 ans (%)			21-30 ans (%)			31-50 ans (%)			+50 ans (%)			Total		
	OUI	**NON**	**Peut-être**	**OUI**	**NON**	**Peut-être**	**OUI**	**NON**	**Peut-être**	**OUI**	**NON**	**Peut-être**	**OUI**	**NON**	**Peut-être**	**OUI**	**NON**	**Peut-être**
Connaissez-vous l'I3D ?	89	11	0	100	0	0	100	0	0	94	6	0	84	16	0	91	9	0
Connaissez-vous l'I3D alimentaire ?	37	63	0	21	79	0	35	65	0	28	72	0	32	68	0	33	67	0
Consommation quotidienne ?	39	59	2	32	68	0	41	59	0	44	56	0	16	81	3	35	63	2
Consommation "thérapeutique" ?	77	22	1	95	5	0	100	0	0	94	0	6	84	16	0	84	14	1

La perception de l'aliment par les personnes interrogées peut sembler contradictoire au vu des résultats présentés sur la **Figure 4.2**. Leur opinion par rapport à la « qualité » de l'aliment imprimé dépend largement des connaissances sur l'I3D « classique ». Pour l'anecdote, au cours de ces quatre dernières années, plusieurs personnes m'ont demandé si nous allions réellement leur faire manger « du plastique ». Cette réaction est symptomatique du transfert d'une technologie non alimentaire vers l'alimentaire. Les **Figure 4.2a** et **Figure 4.2b** reflètent assez bien cet état d'esprit, en montrant que lorsque les « consommateurs » ont intégré le fait que les objets imprimés sont comestibles, ils se posent alors les questions légitimes relatives à tout aliment préparé de manière non conventionnelle ou industrielle : l'aliment est-il bon pour moi ? Les **Figure 4.2c** et **Figure 4.2d** permettent de voir qu'un aliment imprimé peut être très facilement considéré comme un aliment ultra-transformé et donc considéré comme non naturel. Encore une fois, ceci peut s'expliquer par le manque d'informations disponibles, à la fois concernant la technologie utilisée, mais également sur la définition même d'un aliment ultra-transformé. En effet, un aliment ultra-transformé se définit comme un aliment dont la liste d'ingrédients contient au moins une substance elle-même ultra-transformée, dénommée marqueur d'ultra-transformation (Davidou, Christodoulou, Fardet & Frank, 2020). Ces substances sont obtenues par synthèse, ou bien par une succession de procédés physiques, chimiques ou biologiques appliqués à des matières premières naturelles et qui conduisent à une forte dégradation par rapport à leur matrice d'origine. Les ingrédients marqueurs d'ultra-transformation prennent différentes formes et ne se limitent pas aux additifs. S'y retrouve donc une partie (et non pas la totalité) des additifs référencés, mais aussi des glucides hydrolysés, des matières grasses hydrogénées, des protéines isolées, et d'autres ingrédients obtenus grâce aux procédés de « *cracking* alimentaire[32] » (Davidou et al., 2020). Les aliments imprimés en 3D ne rentrent donc pas dans cette catégorie (tout du moins ceux développés dans l'unité QuaPA). Néanmoins, ces réactions sont légitimes et démontrent le rôle essentiel de la communication, du laboratoire vers le grand public.

Quand les personnes interrogées prennent conscience de l'utilité de l'I3D alimentaire pour la fabrication d'aliments fonctionnels, c'est-à-dire en reconnaissant qu'une plus-value peut être apportée (une texture adaptée dans notre cas), leur perception évolue, l'aliment étant alors considéré comme sain et utile (**Figure 4.2**).

[32] Le *cracking* est une opération qui consiste à fractionner des aliments bruts. Ils sont « cassés » pour isoler certains éléments constitutifs. Exemples : séparation du gluten du blé, des protéines du soja ou de l'amidon des pommes de terre.

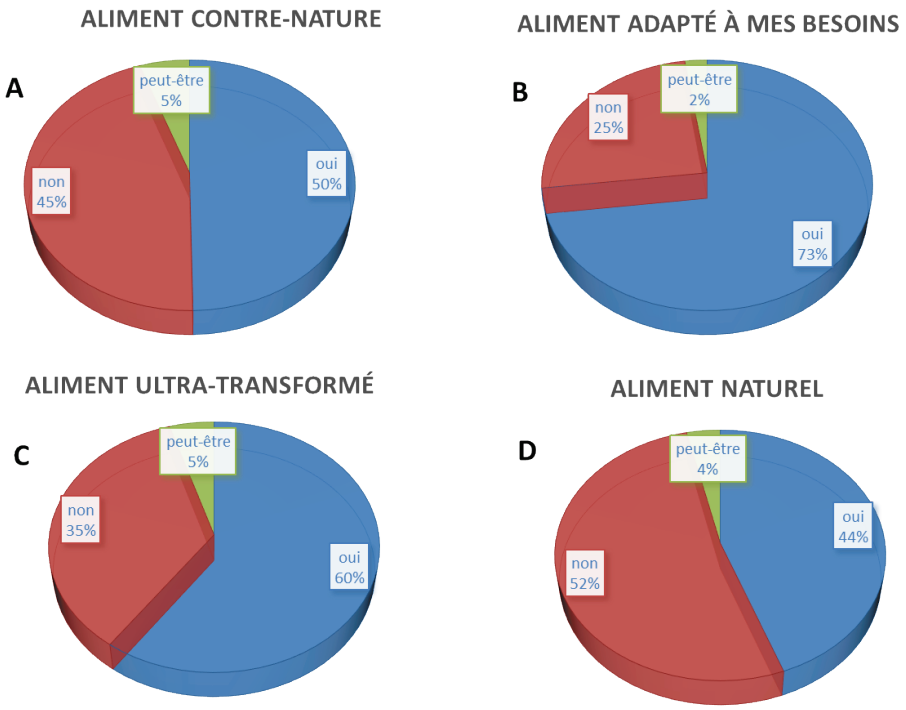


Figure 4.2. *Perception des aliments imprimés en 3D évaluée sur un panel de 167 personnes.*

Nos recherches en matière de conception d'aliments doivent contribuer à une meilleure durabilité des systèmes alimentaires. La réduction des pertes et gaspillages et la valorisation des coproduits doivent donc faire partie intégrante du processus de conception des futurs aliments. L'I3D de matériaux non comestibles est souvent présentée comme une technologie durable, car l'utilisation de la matière première est optimisée. Pour la consommation énergique, le sujet fait encore débat et des études restent à mener (*cf*. **Chapitre 0**). Concernant l'I3D alimentaire, étant donné le relativement faible niveau d'avancement de cette technologie, le sujet n'a, à notre connaissance, pas été abordé. Dans notre étude, à la question « Les aliments imprimés en 3D peuvent-ils répondre à des problématiques de développement durable ? », les personnes interrogées ont répondu « OUI » à 71 % (**Figure 4.3**). Ceci montre que, même sans connaissance précise de la technologie, les personnes interrogées ont envie de croire que les futurs aliments imprimés le seront d'une manière respectueuse de l'environnement. Il s'agit ici d'un point très important, susceptible de faciliter l'acceptabilité sociale de l'I3D alimentaire.

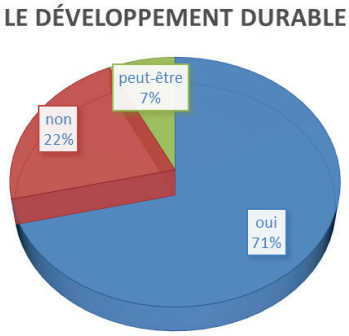


Figure 4.3. *Evaluation de la durabilité de l'impression 3D alimentaire par un panel de 167 personnes.*

Comme le laboratoire apparaît souvent comme un lieu un peu mystérieux, le questionnaire proposé a été aussi l'occasion d'évaluer la confiance qu'accordent les consommateurs aux scientifiques qui développent de nouveaux aliments. Les journées portes ouvertes telles que celles organisées sur notre centre de recherche, en Mai 2019, ont pour but de faire « entrer » le public dans le laboratoire et le faire dialoguer avec les scientifiques. La **Figure 4.4** montre que cette confiance semble majoritairement acquise, même si près d'un tiers des personnes interrogées émettent des réserves quant à la parole du scientifique. Il est intéressant de noter que les catégories de population qui accordent le moins leur confiance aux scientifiques sont les deux extrêmes, à savoir les 5-15 ans et les plus de 50 ans. A l'inverse, ce sont les 21-30 ans qui tendraient à croire davantage les scientifiques.

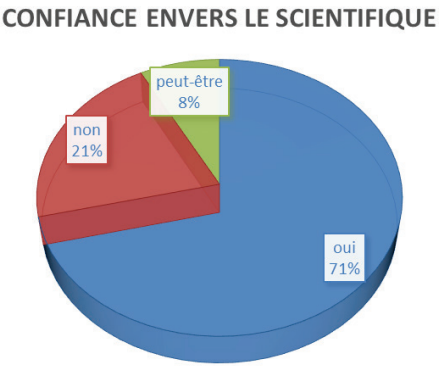


Figure 4.4. *Evaluation de la confiance, par un panel de 167 personnes, dans la parole du scientifique pour la consommation d'aliments imprimés en 3D*

.

4.3.2. Semaine de la dénutrition – Novembre 2022

Organisé par le Collectif de lutte contre la dénutrition, en partenariat avec la Fédération

Hospitalière de France, cet évènement s'inscrit dans le cadre du Plan National Nutrition Santé et vise à sensibiliser les professionnels, comme le grand public, à la prévention et à la prise en charge de cette pathologie.

Les participants à cet évènement étaient répartis en 2 catégories :

- Grand public : plus de 55 ans ;
- Professionnels de santé : domaine de la gériatrie.

Une nouvelle fois, en matière d'I3D alimentaire, les explications que nous avons apportées ont été orientées autour de la nutrition des personnes âgées. Les réactions ont été globalement positives et les questions nombreuses. Il apparaît néanmoins qu'en fonction du niveau d'études ou de la profession exercée, des points techniques suscitent des interrogations quant à la pertinence de la méthode. Bien qu'il s'agisse d'un procédé éprouvé depuis de nombreuses années dans différentes industries, ce fût le cas pour la méthode d'extrusion utilisée en I3D alimentaire. L'aspect innovant n'apparaît donc pas comme un critère d'acceptabilité. Néanmoins, l'utilisation d'un procédé commun, connu d'au moins certaines catégories de personnes, peut éventuellement aider à vaincre le phénomène de néophobie.

L'analyse des réactions d'étonnement, en cours à l'unité TransitionS, permettra de mieux caractériser l'effet de l'I3D alimentaire sur des personnes de plus 55 ans et sur des soignants.

4.3.3. Salon International de l'Agriculture – Février 2023

Un espace du stand INRAE au SIA 2023 a été dédié à la présentation de l'I3D alimentaire durant 8 jours consécutifs. Sept membres de l'équipe Imagerie & Transferts se sont relayés pendant cette période afin de présenter :

- Une imprimante 3D alimentaire commerciale de la marque Foodini (*Natural Machines*, Espagne) en fonctionnement (**Figure 4.5a**) ;
- Des aliments imprimés à base de purée de pomme de terre colorée (**Figure 4.5b**) ;
- Une vidéo du prototype d'imprimante 3D développé et décrit dans le **Chapitre 1**. La vidéo montrait l'impression d'un aliment à base de viande (décrit dans le **Chapitre 3**) (**Figure 4.5b**) ;
- Un discours standardisé destiné à présenter les travaux du laboratoire et contenant les éléments de langage suivants :

  - La différenciation de l'I3D alimentaire purement « esthétique » et « fonctionnelle » ;
  - La notion d'aliments fonctionnels ;
  - Les personnes âgées ou en situation de handicap en tant que cibles privilégiées ;
  - Le côté procédé/technique et l'absence d'additifs ;

- Un questionnaire (**Annexe S 4.1**).

Il s'est avéré que faire remplir le questionnaire à un public très hétérogène, pendant ce type de manifestation, était difficile, voire impossible, car les personnes n'avaient ou ne prenaient pas le temps de le faire. Le questionnaire a donc dû être abandonné. Les éléments donnés ici reposent donc uniquement sur des échanges directs avec les visiteurs.

Les visiteurs rencontrés au cours de ce salon appartenaient à toutes les classes d'âge. Les populations étudiantes/jeunes adultes et les familles avec enfants étaient, cependant, majoritaires. La quasi-totalité des visiteurs a été interloquée par le stand, rares étaient ceux qui connaissaient ou avaient entendu parler d'I3D alimentaire. Les réactions perçues étaient néanmoins très positives. Les visiteurs étaient curieux, surpris qu'une telle démarche de recherche existe. Ils étaient aussi attentifs aux explications, tout en n'hésitant pas à poser des questions. Après avoir bien perçu notre objectif de recherche, beaucoup d'entre eux nous ont félicité pour notre travail. Je partais personnellement avec l'apriori que les jeunes adultes seraient moins sensibles à ces travaux, destinés avant tout aux personnes âgées. Mais, bien au contraire, je me suis rapidement rendu compte qu'ils avaient parfaitement conscience des problèmes d'alimentation des séniors et, si ce n'était pas le cas, ils comprenaient et soutenaient la démarche. En effet, beaucoup de visiteurs avaient, parmi leurs proches, des personnes confrontées à des problèmes de mastication et donc d'alimentation. J'ai personnellement reçu beaucoup de témoignages en ce sens et les visiteurs en profitaient pour poser des questions ou faire part de leurs difficultés. Sur plusieurs centaines de visiteurs, seule une poignée a eu une réaction très négative quant à l'utilisation de l'I3D à des fins alimentaires. Certaines réactions étaient très tranchées avec un rejet direct de la technologie, sans qu'il puisse être possible d'argumenter. Mais, dès qu'il a été possible d'apporter quelques explications, les personnes concernées ont semblé rassurées, voire convaincues par la démarche.

Les personnes concernées par des proches en situation de difficultés alimentaires nous ont demandé à quelle échéance les produits seraient disponibles. Il nous est donc permis de penser que

les futurs aliments fonctionnels imprimés en 3D pourraient être plutôt bien acceptés par les soignants, les aidants ou les proches, mais qu'en sera-t-il des patients eux-mêmes ?

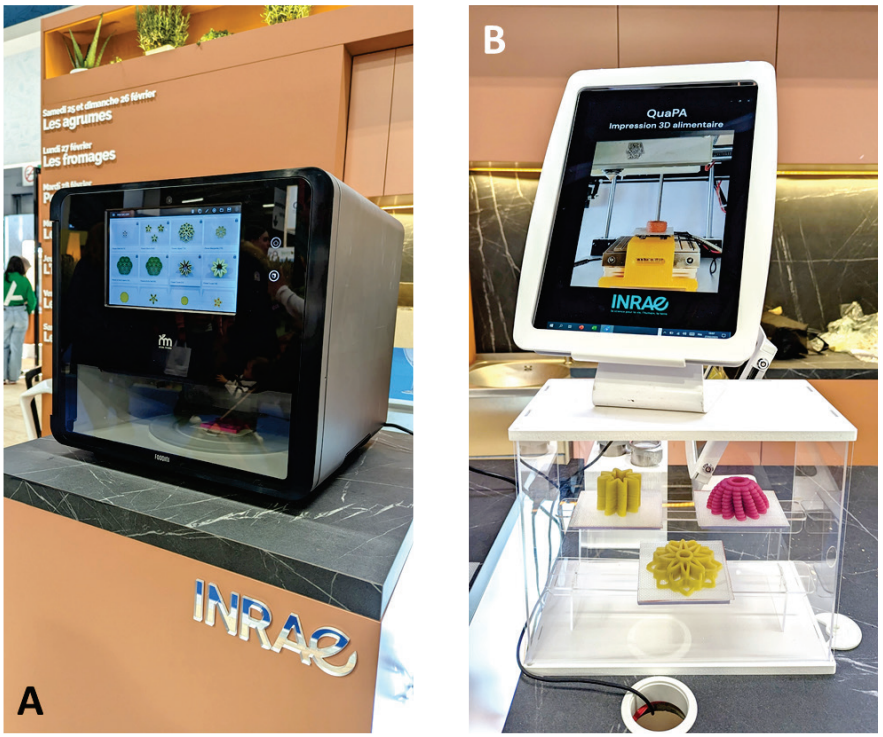


Figure 4.5. *Partie du stand INRAE lors du Salon International de l'Agriculture (SIA) 2023 consacré à l'impression 3D alimentaire : A – Présentation d'une imprimante 3D alimentaire commerciale de marque Foodini (Natural Machine, Espagne) ; B – Exemple d'aliments imprimés sur place et, vidéo d'impression d'un aliment carné avec le prototype d'imprimante 3D développé au laboratoire et présenté dans le* ***Chapitre 1****).*

4.3.4. Association les « Gourmets Curieux » - Avril 2023

Cette association du Puy-de-Dôme regroupe une trentaine de membres qui se réunissent de manière régulière, lors d'évènements thématiques en lien avec la gastronomie. Les thèmes abordés vont de la découverte de spécialités culinaires de différents pays jusqu'aux aspects plus techniques, voire scientifiques en lien avec la préparation des aliments.

Lors de la soirée dédiée à l'I3D alimentaire organisée en avril dernier, 23 personnes ont répondu au questionnaire proposé (**Annexe S 4.1**), dont 56,5 % d'hommes et 43,5 % de femmes. La moyenne d'âge était de 69,7 ans, pour un âge médian de 73,0 ans.

Les réponses au questionnaire ont permis de mettre en évidence une connaissance de l'existence de l'I3D alimentaire plus importante que pour le public de 2019 (**Figure 4.1** et **Figure 4.6**). Il faut pour cela préciser qu'il s'agit ici d'un public très curieux, soucieux de rechercher et d'obtenir des

informations. Néanmoins, le niveau d'information concernant la technologie et les aliments restait très faible.

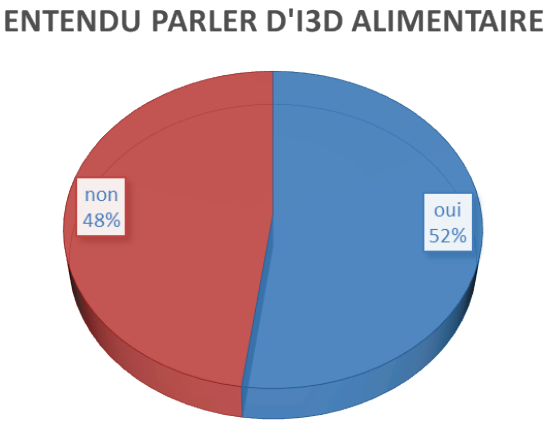


Figure 4.6. *Evaluation de la connaissance de l'impression 3D alimentaire par les membres (n=23) de l'Association « Les Gourmets Curieux » ayant participé à la soirée « Présentation de l'impression 3D alimentaire » d'Avril 2023.*

Les participants ont eu l'occasion de compléter le questionnaire au cours de l'exposé et des explications (à la suite de leur demande). Les résultats de la **Figure 4.7**, très certainement influencés par ce niveau d'information élevé, montrent une large majorité de participants prêts à consommer des aliments imprimés.

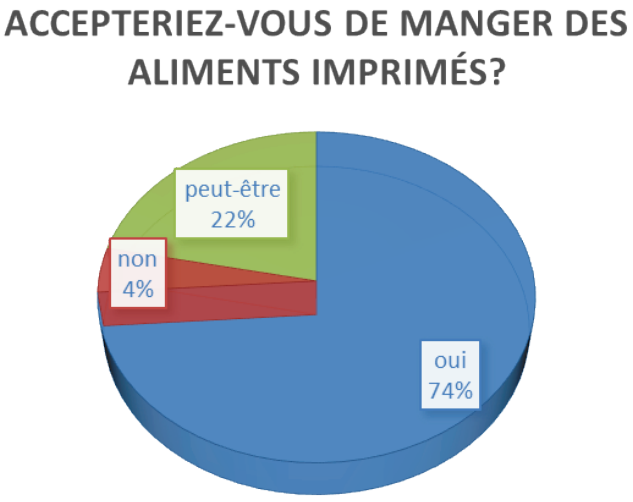


Figure 4.7. *Evaluation de l'acceptation de la consommation d'aliments imprimés par les membres (n=23) de l'Association « Les Gourmets Curieux » ayant participé à la soirée « Présentation de l'impression 3D alimentaire » d'Avril 2023.*

En analysant, à la fois les réponses au questionnaire et le contenu des questions et des discussions, il apparaît que :

- La technologie 3D ou les aliments qui en découlent doivent préférentiellement être destinés à des personnes en difficulté ou en souffrance (personnes âgées ou en situation de handicap) ;
- Le côté ludique ou innovant semble plus important que le rapport au « bien-être » ;
- La curiosité, pour la découverte de la technologie, reste un élément moteur qui peut l'emporter par rapport aux bienfaits potentiels apportés par les aliments fonctionnels ;
- Le goût des aliments imprimés est important. Cette notion a aussi été évoquée par Gayler et al. (2018) qui indiquent que les utilisateurs se montrent très influencés par le plaisir procuré par la technologie alimentaire ; l'accent devrait donc être mis sur la création de contextes d'utilisation dans lesquels l'expérience de l'utilisateur est prioritaire. Les participants ont indiqué que la personnalisation de leurs repas avec l'I3D alimentaire était une utilisation potentielle. Cela offre l'avantage d'impliquer les utilisateurs dans la conception de leurs propres expériences alimentaires, en leur permettant de contrôler des paramètres tels que la composition, le goût et la forme, la production du *design* de l'aliment étant prise en charge par la technologie d'impression ;
- Les hommes et les femmes fournissent des réponses assez similaires. Ceci va à l'encontre des travaux de Moerbeek & Casimir (2005) qui montraient une différence d'acceptabilité entre les deux sexes, avec des femmes moins enclines, dans leur étude, à accepter des aliments issus du génie génétique. Peut-être que les aliments imprimés et les aliments issus du génie génétique n'ont pas le même impact dans l'imaginaire des consommateurs potentiels, ce qui pourrait expliquer des différences d'acceptabilité. Il convient aussi de relativiser les résultats obtenus dans notre étude, qui ont été établis à partir d'un faible nombre de participants.

Lors des discussions post-démonstration, les commentaires du public ont été positifs. Les explications fournies leur ont permis de comprendre la finalité des travaux et de mieux cerner les populations concernées. La composition des aliments était une interrogation majeure, l'aspect « synthétique » des aliments imaginés avant la présentation a été gommé pour laisser place à une envie globale de goûter les produits, afin de « se faire sa propre idée ». Ce point rappelle d'ailleurs un des résultats des travaux conduits par Caulier, Doets & Noort (2020) dans le cas d'applications militaires. En effet, ces auteurs ont montré que le fait de faire consommer à des militaires des barres

énergétiques imprimées en 3D pendant plusieurs semaines, tout en leur proposant de les personnaliser (en termes de texture, de goût et de composition), a nettement contribué à améliorer l'appréciation de ces produits par ce public spécifique, et ainsi, à vaincre leur néophobie.

En quelques mots, cette rencontre avec l'association « Les gourmets curieux » a, une nouvelle fois, mis en évidence l'importance de l'information et la nécessité d'expliquer, de montrer et d'expérimenter. L'acceptabilité des consommateurs ne passera, semble-t-il, que par cette voie axée sur l'information et la pédagogie.

4.4. Perspectives de travail – le projet SAMASTIC

4.4.1. Les questions scientifiques

En termes d'acceptabilité sociale des aliments imprimés et de la technologie d'I3D, le travail qui reste à faire est important et va nécessiter un investissement conséquent dans les années à venir. Le projet SAMASTIC (2023-2024) - Coupler **S**ciences des **A**liments, **MA**stication et **S**ciences et **T**echnologies de l'**I**nformation et de la **C**ommunication pour concevoir des aliments fonctionnels imprimés en 3D socialement acceptables et destinés à des populations présentant des déficiences masticatoires (ANS financée par le département INRAE Transform), dont je suis le porteur, va s'attacher à répondre aux questions scientifiques suivantes :

- Est-il possible d'imprimer en 3D un aliment fonctionnel, riche en protéines, texturé et contenant un substitut salivaire végétal pouvant être libéré progressivement au cours de la mastication ?
- Peut-on optimiser les propriétés texturales et organoleptiques d'un aliment imprimé en 3D, par *design* génératif[33], afin de répondre aux besoins et aux envies de populations souffrant de déficiences masticatoires ?
- Comment évaluer et favoriser l'acceptabilité sociale de cette technologie de rupture et des aliments fonctionnels qu'elle permet de concevoir et de réaliser ?

Le projet SAMASTIC s'inscrit parfaitement dans la suite de mes travaux de thèse.

[33] Le *design* génératif (*generative design*) consiste à automatiser partiellement la conception de pièces/objets grâce à un procédé itératif permettant à un programme informatique de générer différentes possibilités de *design* en fonction de paramètres définis.

4.4.2. La méthode de travail

Cette démarche de recherche pluridisciplinaire va permettre de renforcer et de pérenniser les liens existants entre l'équipe Imagerie & Transferts (UR370 QuaPA) qui dispose d'une expertise dans la conception d'aliments par I3D, le Centre de Recherches en Odontologie Clinique (USC CROC-Transform-Université Clermont-Auvergne) reconnu pour ses travaux sur la mastication et l'unité TransitionS/Institut méditerranéen du risque, de l'environnement et du développement durable (IMREDD), Université Côte d'Azur, laboratoire en sciences et technologies de l'information et de la communication (appartenant au domaine des Sciences Humaines & Sociales) qui développe des recherches autour de l'acceptabilité sociale des innovations technologiques, dont précisément l'I3D alimentaire.

Le contexte scientifique du projet SAMASTIC est en lien direct avec les objectifs de mon travail de thèse. Les personnes âgées, ou en situation de handicap, ou souffrant de pathologies lourdes (cancers de la région cervico-faciale) développent des carences, du fait d'une mauvaise alimentation. Leurs apports quotidiens en protéines de bonne qualité nutritionnelle sont limités par leur difficulté à mastiquer, par la présence potentielle du symptôme de dysphagie, par un déficit de salivation/lubrification de la bouche et/ou du bol alimentaire (Andersson, Johansson, Attström, Edwardsson, Glantz & Larsson, 1995 ; Morales-Bozo et al., 2017) et, par une perte des sensations en lien avec les aspects hédoniques (Bartoshuk, Catalanotto, Hoffman, Logan & Snyder, 2012). Des aliments alternatifs existent (*cf*. **Chapitre 3**), mais ils sont souvent peu appétents et présentent une texture inadéquate face aux capacités orales réelles. Il a été montré aux **Chapitres 1 et 3** que les récentes avancées en termes de maîtrise des procédés et de caractérisation/formulation permettent désormais d'imprimer des aliments à partir de produits et/ou de co-produits animaux, en s'affranchissant de l'utilisation d'additifs.

L'unité Transitions/IMREDD conduit des recherches-actions (Meyer, 2006 ; 2011), en partenariat avec l'Institut universitaire de la face et du cou, l'association pour la réadaptation et l'épanouissement des personnes handicapées (APREH) et le groupe LNA-Santé en charge des personnes âgées dépendantes, afin de qualifier – au plus près des demandes et besoins de ces publics, de leurs familles comme des professionnels – les mécanismes d'acceptabilité sociale de l'I3D alimentaire. Il serait maintenant intéressant de coupler cette action avec la consommation d'aliments fonctionnels. Ce projet a donc aussi pour vocation d'apporter de nouvelles connaissances à des études déjà menées comme celles de Korzen-Bohr et al. (2006) ou de Conroy et al. (2021).

Les résultats du questionnaire présenté à l'association les « Gourmets curieux » ainsi que les échanges avec le public du SIA 2023 (*cf.* 4.3.3 et 4.3.4) ont soulignés que le goût restait une donnée fondamentale à prendre en compte pour les futurs aliments imprimés. Il s'agit en effet d'une question rémanente et dont la solution va conditionner, à elle seule, une part majeure de l'acceptabilité du produit. A la question : « quel goût auront vos aliments imprimés ? », je réponds pour le moment qu'ils auront celui de leur ingrédient principal, à savoir la viande. Toutefois, la texture modifiée de cette viande va-t-elle en modifier le goût ? Ou tout du moins sa perception par le consommateur ?

Afin de maximiser l'acceptabilité des aliments imprimés, ce point devra être étudié par des professionnels. De nombreux chefs cuisiniers s'intéressent à la nutrition des populations fragiles. Dans le cadre de notre travail collaboratif avec l'UR TransitionS, nous avons pu échanger avec le chef doublement étoilé Christian Sinicropi[34] (La Palme d'Or, Cannes) qui souhaite s'allier à cette démarche.

4.4.3. Sorties envisagées et conclusion

La finalité de l'ANS SAMASTIC, qui sera conduite selon une démarche de co-innovation, est double :

- Disposer, à terme, d'un ensemble d'aliments couvrant une large gamme de textures (et donc correspondant à différentes forces de mastication) permettant d'apporter : 1) un complément nutritionnel en protéines de bonne qualité, et 2) un substitut salivaire libérable lors de la mastication ;
- Etudier et évaluer l'acceptabilité sociale : 1) de la technologie d'I3D comme vecteur de bien-être alimentaire pour les publics cibles mentionnés *supra* et, 2) d'un aliment fonctionnel enrichi en substitut salivaire naturel, qui soit un élément de plaisir pour les consommateurs-patients.

La mise au point d'un nouvel aliment via une technologie émergente, telle que l'I3D alimentaire, requiert différentes étapes de développement sur le plan technologique, nutritionnel, mais également en termes d'acceptabilité sociale de cet aliment et de la technologie mise en œuvre. Ceci nécessite une approche pluridisciplinaire, ainsi qu'une collaboration entre des équipes de recherche issues de deux mondes différents : les Sciences Humaines & Sociales et les Sciences du Vivant. Ainsi, la collaboration pérenne entre les unités QuaPA et TransitionS/IMREDD, désormais formalisée par le projet SAMASTIC, représente une évolution positive dans la façon de mener ce type de recherche. Les

[34] Le chef C. Sinicropi est en cours de création d'un nouvel établissement, mais reste impliqué dans la démarche de conception d'aliments imprimés en 3D.

aliments conçus et la technologie d'I3D utilisée sont destinés à améliorer le quotidien et l'état de santé général de personnes fragiles. Compte-tenu de leurs difficultés, de leurs pathologies, la prise en compte de leurs besoins et envies est primordiale, d'une part pour guider les chercheurs dans leurs travaux, mais surtout pour que ces personnes soient impliquées dans une démarche de science participative, avant tout destinée à les aider, notamment en leur facilitant leur quotidien en matière d'alimentation.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse se voulait être une approche multidisciplinaire destinée à comprendre et à maîtriser les mécanismes liés à la texturation d'aliments carnés à destination de populations ciblées, en particulier les personnes âgées. L'impression 3D a été choisie comme procédé de mise en œuvre de ces aliments, afin de pouvoir contrôler leurs géométries interne et externe, en prenant en compte les verrous technologiques relatifs aux matrices carnées.

La modification d'une imprimante 3D existante (**Chapitre 1**), notamment par l'intégration d'un doseur de précision régulé en température (tête d'impression), ainsi que d'un dispositif refroidissant, destiné à favoriser la prise en masse des échantillons au niveau de la zone d'impression (plateau), a permis de lever un certain nombre de verrous relatifs aux produits carnés en améliorant nettement l'imprimabilité de gels de gélatine. Cette approche a permis de proscrire l'utilisation d'additifs texturants. Les profondes modifications apportées au système de contrôle et de pilotage de l'imprimante permettent désormais une maîtrise des géométries imprimées et, autorisent également le couplage avec une solution de post-traitement. Il apparaît néanmoins que la mise au point de textures adaptées pour des personnes présentant des difficultés masticatoires reste complexe et que l'exploration de méthodes alternatives ou complémentaires, comme le recours à la texturation par la réaction de glycation, est nécessaire pour envisager la conception d'une gamme d'aliments adaptée au plus grand nombre.

Les travaux relatés dans le **Chapitre 2** avaient pour ambition d'explorer le potentiel de la réaction de glycation, en tant que méthode de texturation des aliments carnés imprimés. Les résultats obtenus ont mis en avant la complexité liée à la maîtrise de cette réaction à des fins de texturation dans des milieux à base de gélatine, mais ont toutefois permis de mieux comprendre l'impact de la matrice sur la glycation. En effet, une approche multidisciplinaire a permis de mettre en évidence des réactions de *O*- et *N*-glycation favorisées par une teneur en eau initiale élevée de la gélatine ainsi qu'un effet de ces réactions sur l'ultrastructure des gels de gélatine, notamment par l'observation de la formation d'agrégats. L'ajout de *D*-ribose induit de nombreuses variations de la structure chimique des gels de gélatine, notamment au niveau des triple-hélices et, des marqueurs de la réaction ont pu être identifiés.

La variabilité de la matière première, notamment en lien avec ses conditions de conservation et d'utilisation, limite considérablement son utilisation en tant qu'aliment modèle. Néanmoins, l'effet de la glycation, directement au sein d'une matrice viande, reste à étudier en termes de propriétés texturales. Comme il a été mentionné dans le **Chapitre 3**, le broyage poussé de la viande et, surtout l'ajout de mucilage destiné à favoriser la mastication, ont un impact sur les propriétés rhéologiques et d'écoulement lors de l'extrusion. La réaction de glycation pourrait alors être une solution alternative et

complémentaire pour ajuster la texture de l'aliment. Le travail effectué dans le **Chapitre 2** sera donc à transposer sur un milieu à base de viande, afin d'évaluer la pertinence d'une telle approche sur ce type de matrice.

L'analyse des résultats du **Chapitre 3** constitue une première approche permettant de guider le choix entre différentes formulations de façon à identifier celles qui seraient les mieux adaptées à l'extrusion par I3D. Il apparaît que l'ajout de 6 % de mucilage de graines de lin améliore l'imprimabilité des matrices à base de viande testées et, qu'une concentration en sel de 1,5 % limite la déstructuration de la viande lors de l'extrusion. Une association entre ces deux formulations peut donc être envisagée, tout en prenant en compte la vitesse d'extrusion, qui semble jouer un rôle majeur sur la viscosité des formulations. L'étude des propriétés d'imprimabilité se poursuit actuellement par l'utilisation d'outils de modélisation (résultats non présentés dans ce mémoire). Des premières simulations ont été réalisées, en considérant les différentes formulations comme des fluides incompressibles non-Newtoniens ayant un comportement pseudo-plastique. Un modèle axisymétrique bidimensionnel de l'écoulement dans la seringue et la buse d'impression a été développé sous *Comsol Multiphysics®* (Comsol Inc, Suède) pour calculer la vitesse, le taux de cisaillement, la viscosité et la distribution de la pression lors du processus d'extrusion (basé sur la loi de Carreau-Yasuda : Guo, Zhang & Devahastin, 2020), et ce, afin d'explorer les effets de la formulation et des paramètres du procédé tels que la vitesse d'extrusion. Les forces engendrées lors de l'extrusion ont également été simulées et seront comparées aux valeurs expérimentales obtenues par le texturomètre couplé au simulateur d'extrusion (**Chapitre 3**). Les premiers résultats simulés montrent que l'historique de la déformation (somme des réponses des déformations pour chaque incrément de contraintes pris individuellement) n'influence pas la viscosité des formulations, contrairement aux mesures expérimentales. Bien que cela n'ait pas d'impact sur le schéma de simulation puisque les produits testés ont toujours le même historique, cela devra rester un paramètre à contrôler pour les futurs développements. Des expérimentations complémentaires seront nécessaires pour affiner les simulations et permettre, à terme, d'évaluer le potentiel de formulations plus ou moins complexes pour la conception d'aliments fonctionnels imprimés en 3D.

Les outils de modélisation s'avèreront aussi précieux pour comprendre et évaluer l'impact du post-traitement (cuisson) des aliments imprimés en 3D. Comme évoqué dans le **Chapitre 1**, le post-traitement des aliments imprimés est une étape cruciale pour le maintien des fonctionnalités apportées. La maîtrise de cette étape passe par un contrôle précis des durées et des températures de cuisson. Des travaux sur ces aspects ont été développés en parallèle de ce travail de thèse (résultats

non présentés dans ce mémoire) et, ont abouti à une solution par cuisson laser *in situ*, permettant un traitement couche par couche de l'aliment, tout en évitant la formation de composés néoformés néfastes. Cette solution semble efficace pour obtenir une cuisson homogène, mais des analyses complémentaires, à la fois par microscopie et par modélisation sont nécessaires pour estimer les températures réellement atteintes au sein des couches d'aliment imprimés. De ces températures va dépendre la texture finale de l'aliment, mais aussi sa qualité microbiologique.

La phase de post-traitement aura également un impact sur la qualité nutritionnelle de l'aliment. Cette dernière nécessitera une évaluation, à plus long terme, notamment concernant l'apport en protéines. Mais, au-delà de cet apport, il conviendra d'en évaluer la digestibilité dans les conditions les plus proches des conditions physiologiques. C'est pourquoi il est prévu de coupler les méthodes de mastication artificielle (USC CROC) avec un système de digestion artificielle (UR QuaPA). Cette approche permettra d'évaluer l'impact du procédé d'I3D, de la formulation et de la texture de l'aliment imprimé dans le cas d'une mastication saine ou dégradée.

Une approche novatrice et originale, faisant partie intégrante du projet ANS SAMASTIC, va être étudiée à la suite de ce travail de thèse afin d'optimiser la conception des aliments imprimés : le design génératif. Cette façon de concevoir de nouveaux aliments va devenir incontournable, étant donné la diversité des ingrédients disponibles, la volonté d'en améliorer les fonctionnalités, mais aussi afin de stimuler l'appétence des consommateurs (Al-Sarayreh, Gomes Reis, Carr & Reis, 2023). A noter que l'approche proposée par ces auteurs relève davantage de l'ingénierie inverse, en définissant au préalable les besoins et spécificités de l'aliment, plutôt que d'une optimisation de sa géométrie. Par exemple, la texture finale du produit n'est actuellement pas considérée, ce qui constitue un verrou pour les aliments destinés aux personnes présentant des déficiences masticatoires. Cette méthode, basée sur l'optimisation de la géométrie et de la quantité de matière en fonction de contraintes physiques appliquées (compression, étirement, cisaillement, *etc.*), est d'ores et déjà utilisée en industrie pour limiter le gaspillage de matière première et optimiser les procédés en construction mécanique, mais elle n'est pas appliquée dans le domaine alimentaire. Notre objectif sera d'évaluer la pertinence de sa transposition au secteur alimentaire, en se basant sur les travaux présentés tout au long de ce mémoire et en intégrant des données physiologiques (force de mastication en conditions dégradées) issues de la littérature. L'ensemble de ces données devrait permettre : 1) d'optimiser la géométrie de l'aliment en fonction de la cavité buccale (volume, forme, *etc.*) et des forces mises en œuvre lors de la mastication, 2) de définir la structure interne (épaisseur de parois, nombre d'alvéoles/zones vides) nécessaire pour contenir une quantité adéquate de substitut salivaire à base de mucilage de graines de lin, qui sera

incorporé à l'aliment *via* les méthodes d'I3D (*cf*. **Chapitre 3**), et 3) d'obtenir un ou plusieurs prototypes d'aliment, dont le visuel et la méthode de conception/fabrication pourront être évalués en termes d'acceptabilité sociale selon les méthodes initiées dans le **Chapitre 4**. Le design génératif sera donc utilisé comme un outil d'aide à la conception d'aliments, après un comparatif des différents logiciels existants. Comme indiqué *supra*, le design génératif est actuellement utilisé pour des matériaux inertes, dont les propriétés mécaniques sont connues. Les bases de données des logiciels devront donc être implémentées pour intégrer des données biologiques et physico-chimiques, propres aux ingrédients alimentaires. Ceci constitue actuellement un verrou important pour le développement de ce type d'approches dans le domaine alimentaire. Les premiers essais réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence cette limite avec le logiciel *Inventor* 3D® (Autodesk, USA), puisqu'il a fallu utiliser les propriétés mécaniques de matériaux non alimentaires tels que le caoutchouc ou le silicone (résultats non présentés). Ce type de logiciel permet néanmoins de définir les zones de l'aliment où des contraintes seront appliquées (par exemple, une force de mastication de 500 N) et, de fixer un pourcentage de réduction de la masse totale, ainsi qu'une masse critique pour l'aliment.

Les futures évolutions du projet de conception d'aliments fonctionnels imprimés en 3D vont aussi consister en une transposition des procédés d'impression vers des imprimantes 3D commerciales, afin de pouvoir assurer une fabrication et une diffusion la plus étendue possible. Des comparaisons inter-laboratoires pourront avoir lieu entre les unités QuaPA, CROC et TransitionS/IMREDD sur des machines équivalentes (Foodini, Natural Machines, Espagne), afin de vérifier la reproductibilité des géométries, mais aussi et surtout, celle des textures obtenues. Cette étape est indispensable pour une fabrication accessible et à plus grande échelle, mais également pour en évaluer l'acceptabilité sociale. En collaboration avec l'unité TransitionS/IMREDD de Nice, ces aliments seront alors présentés, sous le contrôle de soignants et de sociologues, à des patients en CHU (Centre Hospitalier Universitaire) et en EHPAD (Etablissements d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes) de la région PACA (Provence Alpes Côte d'Azur), afin de recueillir les retours d'expérience. Enfin, ce type d'aliments pourra aussi être présenté à d'autres populations cibles, comme les personnes en situation de handicap lourd ou de polyhandicap, pour qui l'alimentation est un défi quotidien. Ceci constitue l'objectif principal de la proposition de projet ANR « Deal4hand », portée par l'UR QuaPA et actuellement en phase d'évaluation.

Références bibliographiques

Aboud, S. A., Altemimi, A. B., Al-Hilphy, A, R. S., Yi-Chen, L. & Cacciola, F. (2019). A Comprehensive Review on Infrared Heating Applications in Food Processing. Molecules, 24(22). https://doi.org/10.3390/molecules24224125.

Abuibaid, A., AlSenaani, A., Hamed, F., Kittiphattanabawon, P. & Maqsood, S. (2020). Microstructural, rheological, gel-forming and interfacial properties of camel skin gelatin. *Food Structure, 26*, 100156. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100156.

Académie d'agriculture de France, (2020). Produits de glycation avancée, produits de Maillard, alimentation et santé. Retrieved from: https://www.academieagriculture.fr/actualites/academie/colloque/academie/produits-de-glycation-avancee-produits-demaillard.

Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Awad, E. A., Leo, T. K., . . . Sazili, A. Q. (2018). Characterization of gelatin from bovine skin extracted using ultrasound subsequent to bromelain pretreatment. *Food Hydrocolloids, 80*, 264-273. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.036.

Ahmed, N., Argirov, O. K., Minhas, H. S., Cordeiro, C. A. A. & Thornalley, J. (2002). Assay of advanced glycation endproducts (AGEs) : surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne-carboxymethyl-lysineand Ne-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochemical Journal, 364*, 1-14.

Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Dalle Ore, F., Benjiba, A. & Puigserver, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Food Chemistry and Toxicology, 66*(7), 926-931.

Al-Sarayreh, M., Gomes Reis, M., Carr, A. & Reis, M. M. d. (2023). Inverse design and AI/Deep generative networks in food design: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology, 138*, 215-228. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.005.

Alhejoury, H. A., Mogharbel, L. F., Al-Qadhi, M. A., Shamlan, S. S., Alturki, A. F., Babatin, W. M., . . . Pullishery, F. (2021). Artificial Saliva for Therapeutic Management of Xerostomia: A Narrative Review. *J Pharm Bioallied Sci, 13*(Suppl 2), S903-S907. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_236_21.

Alouffi, S., Khanam, A., Husain, A., Akasha, R., Rabbani, G. & Ahmad, S. (2022). d-ribose-mediated glycation of fibrinogen: Role in the induction of adaptive immune response. *Chem Biol Interact, 367*, 110147. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110147.

Andersson, G., Johansson, G., Attström, R., Edwardsson, S., Glantz, P.-O. & Larsson, K. (1995). Comparison of the effect of the linseed extract Salinum and a methyl cellulose preparation on the symptoms of dry mouth. *Gerodontology, 12*(1), 12-17.

Angoorani, P., Ejtahed, H. S., Mirmiran, P., Mirzaei, S. & Azizi, F. (2016). Dietary consumption of advanced glycation end products and risk of metabolic syndrome. *Int J Food Sci Nutr, 67*(2), 170-176. https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1137889.

Anis, M. A. & Sreerama, Y. N. (2020). Inhibition of protein glycoxidation and advanced glycation end-product formation by barnyard millet (Echinochloa frumentacea) phenolics. *Food Chem, 315*, 126265. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126265.

ANSES. (2017). CIQUAL. Table de composition nutritionnelle des aliments. Retrieved from: https://ciqual.anses.fr/ Accessed.

ANSES. (2019). Les protéines : Définition, rôle dans l'organisme, sources alimentaires. Retrieved from: https://www.anses.fr/fr/content/les-prot%C3%A9ines.

Anukiruthika, T., Moses, J. A. & Anandharamakrishnan, C. (2020). 3D printing of egg yolk and white with rice flour blends. *Journal of Food Engineering, 265*, 109691. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109691.

Ardabilchi Marand, M., Amjadi, S., Ardabilchi Marand, M., Roufegarinejad, L. & Jafari, S. M. (2020). Fortification of yogurt with flaxseed powder and evaluation of its fatty acid profile, physicochemical, antioxidant, and sensory properties. *Powder Technology, 359*, 76-84. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.09.082.

Astruc, T., Peyrin, F., Venien, A., Labas, R., Abrantes, M., Dumas, P. & Jamme, F. (2012). In situ thermal denaturation of myofibre sub-type proteins studied by immunohistofluorescence and synchrotron radiation FT-IR microspectroscopy. *Food Chem, 134*(2), 1044-1051. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.012.

Asyari, M., Kurniawati, N. & Aminin, A. L. N. (2019). In silico study: the antiglycation potency of aloin on the protein surface of human serum albumin. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 509*, 012087. https://doi.org/10.1088/1757-899x/509/1/012087.

Attaran, M. (2017). The rise of 3-D printing: The advantages of additive manufacturing over traditional manufacturing. *Business Horizons, 60*(5), 677-688. https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.05.011.

Augusto, P. E. D. (2020). Challenges, trends and opportunities in food processing. *Current Opinion in Food Science, 35*, 72-78. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.005.

Avazkhanloo, M., Shahir, M. H., Khalaji, S. & Jafari Anarkooli, I. (2020). Flaxseed extrusion and expansion coupled with enzyme and pelleting changed protein and lipid molecular structure of flaxseed and improved digestive enzymes activity, intestinal morphology, breast muscle fatty acids and performance of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology, 260*. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114341.

Azam, R. S. M., Zhang, M., Bhandari, B. & Yang, C. (2018). Effect of Different Gums on Features of 3D Printed Object Based on Vitamin-D Enriched Orange Concentrate. *Food Biophysics, 13*(3), 250-262. https://doi.org/10.1007/s11483-018-9531-x.

Azarpazhooh, E., Rashidi, H., Sharayei, P., Behmadi, H. & Ramaswamy, H. S. (2021). Effect of flaxseed-mucilage and Stevia on physico-chemical, antioxidant and sensorial properties of formulated cocoa milk. *Food Hydrocolloids for Health, 1*. https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100017.

Bair, S., Yamaguchi, T., Brouwer, L., Schwarze, H., Vergne, P. & Poll, G. (2014). Oscillatory and steady shear viscosity: The Cox–Merz rule, superposition, and application to EHL friction. *Tribology International*, 79, 126-131. https://doi.org/10.1016/j.triboint.2014.06.001.

Baker, M. T., Lu, P., Parrella, J. A. & Leggette, H. R. (2022). Investigating the Effect of Consumers' Knowledge on Their Acceptance of Functional Foods: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods, 11*(8). https://doi.org/10.3390/foods11081135.

Bandiwadekar, C. R., Jagdale, A. D., Durge, A. S., Pachpor, T. A., Tupe, R. S. (2023). Evaluation of different sugars for glycation modifications of chitosan to improve its functionality for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 145, 109104. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109104

Bandyopadhyay, A., Bose, S. & Das, S. (2015). 3D printing of biomaterials. *MRS Bulletin, 40*(02), 108-115. https://doi.org/10.1557/mrs.2015.3.

Barros, K. D. S. & Zwolinski, P. (2016). Influence of the Use/User Profile in the LCA of 3d Printed Products. *Procedia CIRP, 50*, 318-323. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.05.005.

Bartoshuk, L. M., Catalanotto, F., Hoffman, H., Logan, H. & Snyder, D. J. (2012). Taste damage (otitis media, tonsillectomy and head and neck cancer), oral sensations and BMI. *Physiol Behav, 107*(4), 516-526. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.013.

Basiri, S., Haidary, N., Shekarforoush, S. S. & Niakousari, M. (2018). Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydr Polym, 187*, 59-65. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.049.

Bégin-Drolet, A., Dussault, M.-A., Fernandez, S. A., Larose-Dutil, J., Leask, R. L., Hoesli, C. A. & Ruel, J. (2017). Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. *Additive Manufacturing, 15*, 29-39. https://doi.org/10.1016/j.addma.2017.03.006.

Beltagui, A., Kunz, N. & Gold, S. (2020). The role of 3D printing and open design on adoption of socially sustainable supply chain innovation. *International Journal of Production Economics, 221*, 107462. https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2019.07.035.

Benjakul, S. & Kittiphattanabawon, P. (2019). Gelatin. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 121-127): Elsevier.

Benzing-Purdie, L., Ripmeester, J. & Ratcliffe, C. (1985). Effects of temperature on Maillard reaction products. J Agric Food Chem, 33(1), 31-33.

Berglund, D. R. (2002). *Flax: New Uses and Demands. Trends in New Crops and New Uses*: ASHS Press.

Berman, B. (2012). 3-D printing: The new industrial revolution. *Business Horizons, 55*(2), 155-162. https://doi.org/10.1016/j.bushor.2011.11.003.

Bertrand, D. & Dufour, E. (2006). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*: Lavoisier.

Bhat, R. & Karim, A. A. (2014). Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. *J Food Sci Technol, 51*(7), 1326-1333. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0652-9.

Bhatt, K., Vaidya, D., Kaushal, M., Gupta, A., Soni, P., Arya, P., . . . Sharma, C. (2020). Microwaves and Radiowaves: In Food Processing and Preservation. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 9(9), 118-131. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.015.

Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials, 25*(25), 5675-5680. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033.

Birlouez-Aragon, I., Morales, F., Fogliano, V. & Pain, J. P. (2010). The health and technological implications of a better control of neoformed contaminants by the food industry. *Pathol Biol (Paris), 58*(3), 232-238. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.015.

Blutinger, J. D., Tsai, A., Storvick, E., Seymour, G., Liu, E., Samarelli, N., . . . Lipson, H. (2021). Precision cooking for printed foods via multiwavelength lasers. *NPJ Sci Food, 5*(1), 24. https://doi.org/10.1038/s41538-021-00107-1.

Bose, S., Ke, D., Sahasrabudhe, H. & Bandyopadhyay, A. (2018). Additive manufacturing of biomaterials. *Progress in Materials Science, 93*, 45-111. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.08.003.

Boucher, Y., Berteretche, M. V., Farhang, F., Arvy, M. P., Azérad, J. & Faurion, A. (2006). Taste deficits related to dental deafferentation: an electrogustometric study in humans. *Eur J Oral Sci, 114*, 456-464.

Bousquet, C. (2007). Rôle des pluronics sur les propriétés rhéologiques, de séchage et de fracturation des gels « aspirables » de décontamination. *Sciences chimiques et physiques* (Vol. PhD, p. 186). Montpellier, France.: Université de Montpellier II.

Brands, C. M. J., Alink, G. M., van Boekel, M. A. J. S. & Jongen, W. M. F. (2000). Mutagenicity of Heated Sugar−Casein Systems: Effect of the Maillard Reaction. *J Agric Food Chem, 48*(6), 2271-2275. https://doi.org/10.1021/jf9907586.

Bridelli, M. G., Stani, C. & Bedotti, R. (2017). Fourier transform infrared conformational investigation of type I collagen aged by *in vitro* induced dehydration and non-enzymatic glycation treatments. *Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale, 90*(1). https://doi.org/10.4081/jbr.2017.6254.

Brownlee, M. (1995). The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med, 18*(4), 275-281.

Bruker. (2022). Guide de la spectroscopie IRTF. Retrieved from: https://www.bruker.com/fr.html.

Brunner, T. A., Delley, M. & Denkel, C. (2018). Consumers' attitudes and change of attitude toward 3D-printed food. *Food Quality and Preference, 68*, 389-396. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.010.

Buffière, C., Gaudichon, C., Hafnaoui, N., Migné, C., Scilowsky, V., Khodorova, N., . . . Rémond, D. (2017). In the elderly, meat protein assimilation from rare meat is lower than that from meat that is well done. *Am J Clin Nutr, 106*, 1257-1266. https://doi.org/10.3945/ajcn.117.158113.

Cai, W., Uribarri, J., Zhu, L., Chen, X., Swamy, S., Zhao, Z., . . . Vlassara, H. (2014). Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *PNAS, 13*, 4940-4945.

Carocho, M., Morales, P. & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology, 45*(2), 284-295. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007.

Caulier, S., Doets, E. & Noort, M. (2020). An exploratory consumer study of 3D printed food perception in a real-life military setting. *Food Quality and Preference, 86*, 104001. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104001.

Chacón, J. M., Caminero, M. A., García-Plaza, E. & Núñez, P. J. (2017). Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling: Effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection. *Materials & Design, 124*, 143-157. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.03.065.

Chacornac, J., Barnouin, J. & Houlier, M. (1992). Micro-dosage automatisé sur analyseur à transfert de l'azote alpha-aminé circulant. *Reprod Nutr Dev, 33*, 99-108.

Chao, C., Hwang, J. S., Kim, I. W., Choi, R. Y., Kim, H. W. & Park, H. J. (2022). Coaxial 3D printing of chicken surimi incorporated with mealworm protein isolate as texture-modified food for the elderly. *Journal of Food Engineering, 333*, 111151. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111151.

Chapleau, N. & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids, 17*, 273-280. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00077-2.

Chaunier, L., Della Valle, G., Dalgalarrondo, M., Lourdin, D., Marion, D. & Leroy, E. (2017). Rheology and structural changes of plasticized zeins in the molten state. *Rheologica Acta, 56*(11), 941-953. https://doi.org/10.1007/s00397-017-1045-9.

Chaunier, L., Guessasma, S., Belhabib, S., Della Valle, G., Lourdin, D. & Leroy, E. (2018). Material extrusion of plant biopolymers: Opportunities & challenges for 3D printing. *Additive Manufacturing, 21*, 220-233. https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.03.016.

Chen, X., Zhao, H., Wang, H., Xu, P., Chen, M., Xu, Z., . . . Cheng, Y. (2022). Preparation of high-solubility rice protein using an ultrasound-assisted glycation reaction. *Food Res Int, 161*, 111737. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111737.

Chen, J. (2007). Surface texture of foods: perception and characterization. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(6), 583-598. https://doi.org/10.1080/10408390600919031.

Cheng, Y., Wang, W., Zhang, R., Zhai, X. & Hou, H. (2021). Effect of gelatin bloom values on the physicochemical properties of starch/gelatin–beeswax composite films fabricated by extrusion blowing. *Food Hydrocolloids, 113*, 106466. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106466.

Chevalier, F., Chobert, J. M., Popineau, Y., Nicolas, M. G. & Haertlé, T. (2001). Improvement of functional properties of b-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal 11*, 145-152.

Chia, H. N. & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng, 9*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4.

Chouarfa, F. (2021). Étude rhéologique et caractérisation de solutions de biopolymères : Application au chitosane et Chitosane / Gélatine. (p. 91): Université 8 Mai 1945 Guelma.

Cichero, J. A. Y. (2016). Adjustment of Food Textural Properties for Elderly Patients. *J Texture Stud, 47*(4), 277-283. https://doi.org/10.1111/jtxs.12200.

Civille, G. & Szczesniak, A. (1973). Guidelines to training a texture profile panel. *J Texture Stud, 4*, 204-223. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1973.tb00665.x.

Collier, T. A., Nash, A., Birch, H. L. & de Leeuw, N. H. (2016). Intra-molecular lysine-arginine derived advanced glycation end-product cross-linking in Type I collagen: A molecular dynamics simulation study. *Biophys Chem, 218*, 42-46. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.09.003.

Colorado, H. A., Velásquez, E. I. G. & Monteiro, S. N. (2020). Sustainability of additive manufacturing: the circular economy

of materials and environmental perspectives. *Journal of Materials Research and Technology, 9*(4), 8221-8234. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.062.

Comminal, R., Serdeczny, M. P., Pedersen, D. B. & Spangenberg, J. (2019). Motion planning and numerical simulation of material deposition at corners in extrusion additive manufacturing. *Additive Manufacturing, 29*, 100753. https://doi.org/10.1016/j.addma.2019.06.005.

Conroy, D. M., Gan, C., Errmann, A. & Young, J. (2021). Fortifying wellbeing: How Chinese consumers and doctors navigate the role of functional foods. *Appetite, 164*, 105296. https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105296.

Contreras-Calderón, J., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2009). Utility of some indicators related to the Maillard browning reaction during processing of infant formulas. *Food Chemistry*, 114(4), 1265-1270. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.004.

Coopman, R., Van de Vyver, T., Kishabongo, A. S., Katchunga, P., Van Aken, E. H., Cikomola, J., . . . Delanghe, J. R. (2017). Glycation in human fingernail clippings using ATR-FTIR spectrometry, a new marker for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *Clin Biochem, 50*(1-2), 62-67. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.09.001.

Couarraze, G. & Grossiord, J.-L. (2000). Initiation à la rhéologie. Paris: Editions Tech et Doc.

Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zuniga, C., Arai, H., Boirie, Y., . . . Cederholm, T. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing, 43*(6), 748-759. https://doi.org/10.1093/ageing/afu115.

Cucu, T., De Meulenaer, B., Kerkaert, B., Vandenberghe, I. & Devreese, B. (2012). MALDI based identification of whey protein derived tryptic marker peptides that resist protein glycation. *Food Research International, 47*(1), 23-30. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.010.

Cui, H., Zang, Z., Jiang, Q., Bao, Y., Wu, Y., Li, J., . . . Li, B. (2023). Utilization of ultrasound and glycation to improve functional properties and encapsulated efficiency of proteins in anthocyanins. *Food Chem, 419*, 135899. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135899.

Cui, S. W. (2005). *Food Carbohydrates. Chemistry, Physical Properties, and Applications*: CRC Press.

Dalibart, M. & Servant, L. (2000). Spectroscopie dans l'infrarouge. In T. d. l'ingénieur (Ed.), (pp. 1-26).

Dankar, I., Haddarah, A., El Omar, F., Sepulcre, F. & Pujolà, M. (2018). 3D printing technology: The new era for food customization and elaboration. *Trends in Food Science & Technology, 75*, 231-242. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.018.

Dankar, I., Pujolà, M., El Omar, F., Sepulcre, F. & Haddarah, A. (2018). Impact of Mechanical and Microstructural Properties of Potato Puree-Food Additive Complexes on Extrusion-Based 3D Printing. *Food and Bioprocess Technology, 11*(11), 2021-2031. https://doi.org/10.1007/s11947-018-2159-5.

Dardevet, D., Mosoni, L., David, J. & Polakof, S. (2018). Fructose Feeding during the Postabsorptive State Alters Body Composition and Spares Nitrogen in Protein-Energy-Restricted Old Rats. *J Nutr, 148*(1), 40-48. https://doi.org/10.1093/jn/nxx028.

Davidou, S., Christodoulou, A., Fardet, A. & Frank, K. (2020). The holistico-reductionist Siga classification according to the degree of food processing: an evaluation of ultra-processed foods in French supermarkets. *Food Funct, 11*(3), 2026-2039. https://doi.org/10.1039/c9fo02271f.

Degen, J., Hellwig, M. & Henle, T. (2012). 1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J Agric Food Chem, 60*(28), 7071-7079. https://doi.org/10.1021/jf301306g.

Demircan, E. & Ozcelik, B. (2023). Development of affordable 3D food printer with an exchangeable syringe-pump mechanism. *HardwareX, 14*, e00430. https://doi.org/10.1016/j.ohx.2023.e00430.

Deng, C. (2014). Analyses conformationnelles de nouveaux systèmes organisés biomimétiques. (Vol. PhD, p. 151): Université de Lorraine.

Derossi, A., Caporizzi, R., Azzollini, D. & Severini, C. (2018). Application of 3D printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. *Journal of Food Engineering, 220*, 65-75. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.015.

Diañez, I., Gallegos, C., Brito-de la Fuente, E., Martínez, I., Valencia, C., Sánchez, M. C., . . . Franco, J. M. (2019). 3D printing in situ gelification of κ-carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocolloids, 87*, 321-330. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.010.

Dick, A., Bhandari, B., Dong, X. & Prakash, S. (2020). Feasibility study of hydrocolloid incorporated 3D printed pork as dysphagia food. *Food Hydrocolloids, 107*, 105940. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105940.

Dick, A., Bhandari, B. & Prakash, S. (2019a). 3D printing of meat. *Meat Sci, 153*, 35-44. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.03.005.

Dick, A., Bhandari, B. & Prakash, S. (2019b). Post-processing feasibility of composite-layer 3D printed beef. *Meat Sci, 153*, 9-18. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.024.

Dick, A., Bhandari, B. & Prakash, S. (2021). Effect of reheating method on the post-processing characterisation of 3D printed meat products for dysphagia patients. *Lwt, 150*, 111915. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111915.

Dominguez-Hernandez, E., Salaseviciene, A. & Ertbjerg, P. (2018). Low-temperature long-time cooking of meat: Eating quality and underlying mechanisms. *Meat Sci, 143*, 104-113. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.032.

Donaldson, A. I. C., Johnstone, A. M., de Roos, B. & Myint, P. K. (2018). Role of protein in healthy ageing. *European Journal of Integrative Medicine, 23*, 32-36. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.09.002.

Dong, H., Wang, P., Yang, Z. & Xu, X. (2023). 3D printing based on meat materials: Challenges and opportunities. *Curr Res Food Sci, 6*, 100423. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100423.

Dong, X., Pan, Y., Zhao, W., Huang, Y., Qu, W., Pan, J., . . . Prakash, S. (2020). Impact of microbial transglutaminase on 3D printing quality of Scomberomorus niphonius surimi. *Lwt, 124*, 109123. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109123.

Donn, P., Prieto, M. A., Mejuto, J. C., Cao, H. & Simal-Gandara, J. (2022). Functional foods based on the recovery of bioactive ingredients from food and algae by-products by emerging extraction technologies and 3D printing. *Food Bioscience, 49*. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101853.

Duarte, C. M., Nunes, M. C., Gojard, P., Dias, C., Ferreira, J., Prista, C., . . . Sousa, I. (2022). Use of European pulses to produce functional beverages – From chickpea and lupin as dairy alternatives. *Journal of Functional Foods, 98*. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105287.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 350-356.

Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F. & Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids, 43*, 360-376. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.006.

Duconseille, A., Gaillard, C., Santé-Lhoutellier, V. & Astruc, T. (2018). Molecular and structural changes in gelatin evidenced by Raman microspectroscopy. *Food Hydrocolloids, 77*, 777-786. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.020.

Duconseille, A., Traikia, M., Lagrée, M., Jousse, C., Pagès, G., Gatellier, P., . . . Santé-Lhoutellier, V. (2017). The impact of processing and aging on the oxidative potential, molecular structure and dissolution of gelatin. *Food Hydrocolloids, 66*, 246-258. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.034.

Duconseille, A., Wien, F., Audonnet, F., Traore, A., Refregiers, M., Astruc, T. & Santé-Lhoutellier, V. (2017). The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. *Food Hydrocolloids, 66*, 378-388. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.005.

El Kissi, N., Nigen, S. & Pignon, F. (2006). Glissement et rhéométrie. *Rhéologie, 10*, 13-39.

Etxabide, A., Akbarinejad, A., Chan, E. W. C., Guerrero, P., de la Caba, K., Travas-Sejdic, J. & Kilmartin, P. A. (2022). Effect of gelatin concentration, ribose and glycerol additions on the electrospinning process and physicochemical properties of gelatin nanofibers. *European Polymer Journal, 180*, 111597. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111597.

Etxabide, A., Kilmartin, P. A., Maté, J. I. & Gómez-Estaca, J. (2022). Characterization of glucose-crosslinked gelatin films reinforced with chitin nanowhiskers for active packaging development. *Lwt, 154*, 112833. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112833.

Etxabide, A., Kilmartin, P. A., Maté, J. I., Prabakar, S., Brimble, M. & Naffa, R. (2021). Analysis of Advanced Glycation End products in ribose-, glucose- and lactose-crosslinked gelatin to correlate the physical changes induced by Maillard reaction in films. *Food Hydrocolloids, 117*, 106736. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106736.

Etxabide, A., Long, J., Guerrero, P., de la Caba, K. & Seyfoddin, A. (2019). 3D printed lactose-crosslinked gelatin scaffolds as a drug delivery system for dexamethasone. *European Polymer Journal, 114*, 90-97. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.019.

Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Gómez-Arriaran, I., de la Caba, K. & Guerrero, P. (2017). Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films. *Reactive and Functional Polymers, 117*, 140-146. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.04.005.

Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Guerrero, P. & de la Caba, K. (2015). Effects of cross-linking in nanostructure and physicochemical properties of fish gelatins for bio-applications. *Reactive and Functional Polymers, 94*, 55-62. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.006.

Evans, G., de Challemaison, B. & Cox, D. N. (2010). Consumers' ratings of the natural and unnatural qualities of foods. *Appetite, 54*(3), 557-563. https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.02.014.

Eysturskarð, J., Haug, I. J., Elharfaoui, N., Djabourov, M. & Draget, K. I. (2009). Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocolloids, 23*(7), 1702-1711. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.008.

Fabre, J.-F., Lacroux, E., Valentin, R. & Mouloungui, Z. (2015). Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Industrial Crops and Products, 65*, 354-360. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.015.

Fang, X., Du, J., Wei, Z., He, P., Bai, H., Wang, X. & Lu, B. (2017). An investigation on effects of process parameters in fused-coating based metal additive manufacturing. *Journal of Manufacturing Processes, 28*, 383-389. https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2017.01.008.

FAO. (2023). Technical platform on the measurement and reduction of food loss and waste. Retrieved from:

https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/.

Farag, M. M. & Yun, H.-s. (2014). Effect of gelatin addition on fabrication of magnesium phosphate-based scaffolds prepared by additive manufacturing system. *Materials Letters, 132*, 111-115. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.06.055.

Farouk, M. M., Yoo, M. J. Y., Hamid, N. S. A., Staincliffe, M., Davies, B. & Knowles, S. O. (2018). Novel meat-enriched foods for older consumers. *Food Res Int, 104*, 134-142. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.033.

Fawale, S. O., Ramachandran, T., Fathalla, H. & Maqsood, S. (2022). Effect of bleaching and defatting treatment of camel skin on the color, structural and interfacial properties of extracted gelatin. *Food Structure, 33*, 100275. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100275.

Fedeniuk, R. W. & Biliaderis, C. G. (1994). Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum usitatissimum L.*) Mucilage. *J Agric Food Chem, 42*, 240-247.

Feng, C., Zhang, M., Bhandari, B. & Ye, Y. (2020). Use of potato processing by-product: Effects on the 3D printing characteristics of the yam and the texture of air-fried yam snacks. *Lwt, 125*, 109265. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109265.

Feng, N., Shen, Y., Hu, C., Tan, J., Huang, Z., Wang, C., . . . Xiao, J. (2021). Inhibition of Advanced Glycation End Products in Yogurt by Lotus Seedpod Oligomeric Procyanidin. *Front Nutr, 8*, 781998. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.781998.

Fennema, O. & Carpenter, J. (1984). Water Activity in Muscle and Related Tissues. *37th Reciprocal Meat Conference*. Texas, USA: Texas Tech University.

Ferrario, V. F., Sforza, C., Zanotti, G. & Tartaglia, G. M. (2004). Maximal bite forces in healthy young adults as predicted by surface electromyography. *J Dent, 32*(6), 451-457. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.02.009.

Francis-Sedlak, M. E., Uriel, S., Larson, J. C., Greisler, H. P., Venerus, D. C. & Brey, E. M. (2009). Characterization of type I collagen gels modified by glycation. *Biomaterials, 30*(9), 1851-1856. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.014.

French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B. & Green-Church, K. B. (2002). Maillard Reaction Induced Lactose Attachment to Bovine β-Lactoglobulin: Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Examination. *J Agric Food Chem, 50*(4), 820-823. https://doi.org/10.1021/jf010571q.

Fu, X., Liu, Q., Tang, C., Luo, J., Wu, X., Lu, L. & Cai, Z. (2019). Study on structural, rheological and foaming properties of ovalbumin by ultrasound-assisted glycation with xylose. *Ultrason Sonochem, 58*, 104644. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104644.

Fukuchi, K., Jo, K., Tomiyama, A., & Takao, S. (2012). Laser cooking: a novel culinary technique for dry heating using a laser cutter and vision technology. Proceedings of the ACM multimedia 2012 workshop on Multimedia for cooking and eating activities, Nara, Japan.

Furness, S., Worthington, H., Bryan, G., Birchenough, S. & McMillan, R. (2011). Interventions for the management of dry mouth: nonsystemic therapies (Protocol). *The Cochrane Library* (1), 10.

Gallego, M., Barat, J. M., Grau, R. & Talens, P. (2022). Compositional, structural design and nutritional aspects of texture-modified foods for the elderly. *Trends in Food Science & Technology, 119*, 152-163. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.008.

Ganorkar, P. M. & Jain, R. K. (2014). Effect of flaxseed incorporation on physical, sensorial, textural and chemical attributes of cookies. *International Food Research Journal 21*(4), 1515-1521.

Gayler, T., Sas, C. & Kalnikaité, V. (2018). User perceptions of 3D food printing technologies. *ACM*.

Gendron, C. (2014). Penser l'acceptabilité sociale : au-delà de l'intérêt, les valeurs. *Communiquer. Revue de communication sociale et publique*(11), 117-129. https://doi.org/10.4000/communiquer.584.

Giuseppe, M. D., Law, N., Webb, B., R, A. M., Liew, L. J., Sercombe, T. B., . . . Doyle, B. J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater, 79*, 150-157. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.018.

Godoi, F., Bhandari, B., Prakash, S. & Zhang, M. (2019). *Fundamentals of 3D Food Printing and Applications*: Academic Press.

Godoi, F., Prakash, S. & Bhandari, B. (2016). 3d printing technologies applied for food design: Status and prospects. *Journal of Food Engineering, 179*, 44-54.

Goh, K. K. T., Pinder, D. N., Hall, C. E. & Hemar, Y. (2006). Rheological and light scattering properties of flaxseed polysaccharide aqueous solutions. *Biomacromolecules, 7*, 3098-3103.

Gonzalez, L. G. & Wess, T. J. (2013). The effects of hydration on the collagen and gelatine phases within parchment artefacts. *Heritage Science, 1*(14), 1-8. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/2050-7445-1-14.

Gordon, P. L., Huang, C., Lord, R. C. & Yannas, I. V. (1974). The far-infrared spectrum of collagen. *Macromolecules, 7*(6), 954-956. https://doi.org/10.1021/ma60042a052.

Grigor, J. M., Brennan, C. S., Hutchings, S. C. & Rowlands, D. S. (2016). The sensory acceptance of fibre-enriched cereal foods: a meta-analysis. *International Journal of Food Science & Technology, 51*(1), 3-13. https://doi.org/10.1111/ijfs.13005.

Guazzelli, E. (2001). Rhéologie des fluides complexes. In E. d'ingénieur (Ed.), (p. 38).

Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., . . . Guillemot, F. (2010). Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials, 31*(28), 7250-7256. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.055.

Gujral, H. S., Kaur, A., Singh, N. & Sodhi, N. S. (2002). Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat. *Journal of Food Engineering, 53*, 377-385.

Gullón, B., Gagaoua, M., Barba, F. J., Gullón, P., Zhang, W. & Lorenzo, J. M. (2020). Seaweeds as promising resource of bioactive compounds: Overview of novel extraction strategies and design of tailored meat products. *Trends in Food Science & Technology, 100*, 1-18. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.039.

Gumussoy, M., Atmis, V., Yalcin, A., Bahsi, R., Yigit, S., Ari, S., . . . Silay, K. (2021). Malnutrition-sarcopenia syndrome and all-cause mortality in hospitalized older people. *Clin Nutr, 40*(11), 5475-5481. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.09.036.

Guo, C., Zhang, M. & Devahastin, S. (2020). 3D extrusion-based printability evaluation of selected cereal grains by computational fluid dynamic simulation. *Journal of Food Engineering, 286*, 110113. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110113.

Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P. & Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple-helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules, 36*, 9999-10008. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ma034264s.

Guzzi Plepis, A. M. D., Goissis, G. & Das-Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering & Science, 36*(24), 2932-2938. https://doi.org/10.1002/pen.10694.

Hamilton, C. A., Alici, G. & in het Panhuis, M. (2018). 3D printing Vegemite and Marmite: Redefining "breadboards". *Journal of Food Engineering, 220*, 83-88. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.008.

Han, P., Tofangchi, A., Deshpande, A., Zhang, S., & Hsu, K. (2019). An approach to improve interface healing in FFF-3D printed Ultem 1010 using laser pre-deposition heating. Procedia Manufacturing, 34, 672-677. https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.06.195.

Hao, L., Mellor, S., Seaman, O., Henderson, J., Sewell, N. & Sloan, M. (2010). Material characterisation and process development for chocolate additive layer manufacturing. *Virtual and Physical Prototyping, 5*(2), 57-64. https://doi.org/10.1080/17452751003753212.

Hée, G., Balty, I., Mayer, A., Courant, D. & Lièvre, M. (1998). Les lasers, risques et prévention. *Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail INRS, 173*(4ème trimestre), 445-463.

Hegab, Z., Gibbons, S., Neyses, L. & Mamas, M. A. (2012). Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol, 4*(4), 90-102. https://doi.org/10.4330/wjc.v4.i4.90.

Heigel, J. C., Michaleris, P., & Reutzel, E. W. (2015). Thermo-mechanical model development and validation of directed energy deposition additive manufacturing of Ti–6Al–4V. Additive Manufacturing, 5, 9-19. https://doi.org/10.1016/j.addma.2014.10.003.

Hennequin, M., Allison, P. J., Veyrune, J. L., Faye, M. & Peyron, M. (2005). Clinical evaluation of mastication: validation of video versus electromyography. *Clin Nutr, 24*(2), 314-320. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.010.

Hernandez Saluena, B., Saenz Gamasa, C., Dineiro Rubial, J. M. & Alberdi Odriozola, C. (2019). CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat Sci, 157*, 107889. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889.

Hertafeld, E., Zhang, C., Jin, Z., Jakub, A., Russell, K., Lakehal, Y., . . . Lipson, H. (2019). Multi-Material Three-Dimensional Food Printing with Simultaneous Infrared Cooking. *3D Printing and Additive Manufacturing, 6*(1), 13-19. https://doi.org/10.1089/3dp.2018.0042.

Hinton, T. J., Jallerat, Q., Palchesko, R. N., Park, J. H., Grodzicki, M. S., Shue, H.-J., . . . Feinberg, A. W. (2015). Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Science Advances, 1*(9). https://doi.org/10.1126/sciadv.1500758.

Holland, S., Foster, T., MacNaughtan, W. & Tuck, C. (2018). Design and characterisation of food grade powders and inks for microstructure control using 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 12-19. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.008.

Hopcraft, M. S. & Tan, C. (2010). Xerostomia: an update for clinicians. *Aust Dent J*, 55(3), 238-244; quiz 353. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01229.x.

Hrynets, Y., Ndagijimana, M. & Betti, M. (2013). Non-enzymatic glycation of natural actomyosin (NAM) with glucosamine in a liquid system at moderate temperatures. *Food Chemistry, 139*(1), 1062-1072. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.026.

Huang, M.-s., Zhang, M. & Bhandari, B. (2019). Assessing the 3D Printing Precision and Texture Properties of Brown Rice Induced by Infill Levels and Printing Variables. *Food and Bioprocess Technology*. https://doi.org/10.1007/s11947-019-02287-x.

Huang, R., Riddle, M., Graziano, D., Warren, J., Das, S., Nimbalkar, S., . . . Masanet, E. (2016). Energy and emissions saving potential of additive manufacturing: the case of lightweight aircraft components. Journal of Cleaner Production,

135, 1559-1570. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.109.

Huang, M. s., Zhang, M., Bhandari, B. & Liu, Y. (2019). Improving the three-dimensional printability of taro paste by the addition of additives. *Journal of Food Process Engineering*, e13090. https://doi.org/10.1111/jfpe.13090.

Huang, S. H., Liu, P., Mokasdar, A. & Hou, L. (2013). Additive manufacturing and its societal impact: a literature review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 67*(5-8), 1191-1203. https://doi.org/10.1007/s00170-012-4558-5.

Hurtado-Romero, A., Zepeda-Hernández, A., Uribe-Velázquez, T., Rosales-De la Cruz, M. F., Raygoza-Murguía, L. V., Garcia-Amezquita, L. E. & García-Cayuela, T. (2023). Utilization of blueberry-based ingredients for formulating a synbiotic Petit Suisse cheese: Physicochemical, microbiological, sensory, and functional characterization during cold storage. *Lwt, 183*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114955.

Inglett, G. E., Chen, D. & Lee, S. (2013). Rheological Properties of Barley and Flaxseed Composites. *Food and Nutrition Sciences, 04*(01), 41-48. https://doi.org/10.4236/fns.2013.41007.

Inzana, J. A., Olvera, D., Fuller, S. M., Kelly, J. P., Graeve, O. A., Schwarz, E. M., . . . Awad, H. A. (2014). 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials, 35*(13), 4026-4034. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.

Irwin, M. (2007). Caramel-Pumping 3D Fabricator Has Couple on a Sugar High. *Wired Magazine*.

Jagadiswaran, B., Alagarasan, V., Palanivelu, P., Theagarajan, R., Moses, J. A. & Anandharamakrishnan, C. (2021). Valorization of food industry waste and by-products using 3D printing: A study on the development of value-added functional cookies. *Future Foods, 4*, 100036. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100036.

Jaisson, S., Desmons, A., Gorisse, L. & Gillery, P. (2017). Protein molecular aging: which role in physiopathology? *Med Sci, 33*(2), 176-182. https://doi.org/10.1051/medsci/20173302013.

Jaisson, S. & Gillery, P. (2018). Les produits de glycation avancée des protéines. *Revue Francophone des Laboratoires, 2018*(502), 48-55. https://doi.org/10.1016/s1773-035x(18)30148-5.

Jakab, K., Norotte, C., Marga, F., Murphy, K., Vunjak-Novakovic, G. & Forgacs, G. (2010). Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication, 2*(2), 022001. https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/2/022001.

Jalabert-Malbos, M.-L., Mishellany-Dutour, A., Woda, A. & Peyron, M.-A. (2007). Particle size distribution in the food bolus after mastication of natural foods. *Food Quality and Preference, 18*(5), 803-812. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.01.010.

Jiang, H., Zheng, L., Zou, Y., Tong, Z., Han, S. & Wang, S. (2019). 3D food printing: main components selection by considering rheological properties. *Crit Rev Food Sci Nutr, 59*(14), 2335-2347. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1514363.

Jiang, J., Zhang, M., Bhandari, B. & Cao, P. (2020). Development of Chinese yam/chicken semi-liquid paste for space foods. *Lwt, 125*, 109251. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109251.

Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A. & Djabourov, M. (2002). All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir, 18*, 7158-7166. https://doi.org/10.1021/la020190m.

Joly-Duhamel, C., Hellio, D. & Djabourov, M. (2002). All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry. *Langmuir, 18*, 7208-7217. https://doi.org/10.1021/la020189n.

Jonkers, N., van Dommelen, J. A. W. & Geers, M. G. D. (2020). Experimental characterization and modeling of the mechanical behavior of brittle 3D printed food. *Journal of Food Engineering, 278*, 109941. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109941.

Joshi, K., Shabani, E., Kabir, S. M. F., Zhou, H., McClements, D. J. & Park, J. H. (2023). Optimizing Protein Fiber Spinning to Develop Plant-Based Meat Analogs via Rheological and Physicochemical Analyses. *Foods, 12*(17). https://doi.org/10.3390/foods12173161.

Kaewmanee, T., Bagnasco, L., Benjakul, S., Lanteri, S., Morelli, C. F., Speranza, G. & Cosulich, M. E. (2014). Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chem, 148*, 60-69. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.022.

Kantar TNS. FoodTech: « les Millenials révolutionnent l'alimentation ». www.mbanmci.com. (https://mbamci.com/foodtech-millenials-et-alimentation/), 2017.

Kantar Worldpanel « A la découverte des « flexitariens » : Qui sont ces foyers qui souhaitent réduire leur consommation de protéines animales ? » Newsletter n°48. https://www.kantarworldpanel.com/fr/A-la-une/Newsletter- 48, 2016.

Karyappa, R. & Hashimoto, M. (2019). Chocolate-based Ink Three-dimensional Printing (Ci3DP). *Sci Rep, 9*(1), 14178. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50583-5.

Katayama, S., Shima, J. & Saeki, H. (2002). Solubility improvement of shellfish muscle proteins by reaction with glucose and its soluble state in low-ionic-strength medium. *J Agric Food Chem, 50*, 4327-4332.

Kaur, M., Kaur, R. & Punia, S. (2018). Characterization of mucilages extracted from different flaxseed (Linum usitatissiumum L.) cultivars: A heteropolysaccharide with desirable functional and rheological properties. *Int J Biol Macromol, 117*, 919-927. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.010.

Kaur, R., Kaur, M. & Gill, B. S. (2017). Phenolic acid composition of flaxseed cultivars by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities: Effect of sand roasting and microwave heating. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(5). https://doi.org/10.1111/jfpp.13181.

Kellens, K., Mertens, R., Paraskevas, D., Dewulf, W. & Duflou, J. R. (2017). Environmental Impact of Additive Manufacturing Processes: Does AM Contribute to a More Sustainable Way of Part Manufacturing? *Procedia CIRP, 61*, 582-587. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.11.153.

Kewuyemi, Y. O., Kesa, H. & Adebo, O. A. (2021). Trends in functional food development with three-dimensional (3D) food printing technology: prospects for value-added traditionally processed food products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-38. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1920569.

Khosravani, M. R. & Reinicke, T. (2020). On the environmental impacts of 3D printing technology. *Applied Materials Today, 20*, 100689. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100689.

Khouryieh, H. & Aramouni, F. (2013). Effect of flaxseed flour incorporation on the physical properties and consumer acceptability of cereal bars. *Food Sci Technol Int, 19*(6), 549-556. https://doi.org/10.1177/1082013212462231.

Kietzmann, J., Pitt, L. & Berthon, P. (2015). Disruptions, decisions, and destinations: Enter the age of 3-D printing and additive manufacturing. *Business Horizons, 58*(2), 209-215. https://doi.org/10.1016/j.bushor.2014.11.005.

Kim, H. W., Bae, H. & Park, H. J. (2018). Reprint of: Classification of the printability of selected food for 3D printing: Development of an assessment method using hydrocolloids as reference material. *Journal of Food Engineering, 220*, 28-37.

Kim, H. W., Lee, I. J., Park, S. M., Lee, J. H., Nguyen, M.-H. & Park, H. J. (2019). Effect of hydrocolloid addition on dimensional stability in post-processing of 3D printable cookie dough. *Lwt, 101*, 69-75. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.019.

Koch, L., Hummel, L., Schuchmann, H. P. & Emin, M. A. (2018). Improving the emulsifying properties of whey protein isolate-citrus pectin blends by a novel reactive extrusion approach. *Journal of Food Engineering, 223*, 175-188. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.027.

Kondjoyan, A., Chevolleau, S., Greve, E., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., Bruel, S., . . . Debrauwer, L. (2010). Formation of heterocyclic amines in slices of Longissimus thoracis beef muscle subjected to jets of superheated steam. *Food Chemistry, 119*(1), 19-26. https://doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.081.

Kondjoyan, A., Portanguen, S., Duchène, C., Mirade, P. S. & Gandemer, G. (2018). Predicting The Loss Of Vitamins B3 (Niacin) And B6 (Pyridoxamine) In Beef During Cooking. *Journal of Food Engineering, 238*, 44-53. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.008.

Korpela, R. & Saxelin, M. (2005). Functional dairy products - the Nordic perspective. *Australian Journal of Dairy Technology, 60*(2), 170-172.

Korzen-Bohr, S. & O'Doherty Jensen, K. (2006). Heart disease among post-menopausal women: acceptability of functional foods as a preventive measure. *Appetite*, 46(2), 152-163. https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.11.003.

Kousani, A. Z., Adams, S., Whyte, D. J., Oliver, R., Hemsley, B., Palmer, S. & Balandin, S. (2017). 3D printing of food for people with swallowing difficulties. In S. o. E. Paul K. Collins, Deakin University and Ian Gibson, School of Engineering, Deakin University (Ed.), *DesTech Conference Proceedings. The International Conference on Design and Technology* (pp. 23-29). Australia: Deakin University.

Kozlov, P. V. & Burdygina, G. I. (1983). The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification *Polymer reviews, 24*, 651-666.

Krujatz, F., Lode, A., Seidel, J., Bley, T., Gelinsky, M., & Steingroewer, J. (2017). Additive Biotech-Chances, challenges, and recent applications of additive manufacturing technologies in biotechnology. N Biotechnol, 39(Pt B), 222-231. . https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.001.

Kuai, L., Liu, F., Ma, Y., Goff, H. D. & Zhong, F. (2020). Regulation of nano-encapsulated tea polyphenol release from gelatin films with different Bloom values. *Food Hydrocolloids, 108*, 106045. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106045.

Kunieda, K., Fujishima, I., Wakabayashi, H., Ohno, T., Shigematsu, T., Itoda, M., . . . Ogawa, S. (2021). Relationship Between Tongue Pressure and Pharyngeal Function Assessed Using High-Resolution Manometry in Older Dysphagia Patients with Sarcopenia: A Pilot Study. *Dysphagia, 36*(1), 33-40. https://doi.org/10.1007/s00455-020-10095-1.

Kutzli, I., Gibis, M., Baier, S. K. & Weiss, J. (2018). Formation of Whey Protein Isolate (WPI)–Maltodextrin Conjugates in Fibers Produced by Needleless Electrospinning. *J Agric Food Chem, 66*(39), 10283-10291. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02104.

Kutzli, I., Weiss, J. & Gibis, M. (2021). Glycation of Plant Proteins Via Maillard Reaction: Reaction Chemistry, Technofunctional Properties, and Potential Food Application. *Foods, 10*(376), 1-40. https://doi.org/10.3390/foods10020376.

Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. & Uversky, V. N. (2014). What macromolecular crowding can do to a protein. *Int J Mol Sci, 15*(12), 23090-23140. https://doi.org/10.3390/ijms151223090.

Lai, W. H. & Cheng, C. I. (2008). Manufacturing method of three-dimiensional food by rapid prototyping. (Vol. US

2008/0260918 A1, p. 8). United States.

Lamblin, F., Hano, C., Fliniaux, O., Mesnard, F., Fliniaux, M. A. & Laine, E. (2008). [Interest of lignans in prevention and treatment of cancers]. *Med Sci (Paris), 24*(5), 511-519. https://doi.org/10.1051/medsci/2008245511.

Le Bourhis, F., Kerbrat, O., Dembinski, L., Hascoet, J.-Y. & Mognol, P. (2014). Predictive Model for Environmental Assessment in Additive Manufacturing Process. *Procedia CIRP, 15*, 26-31. https://doi.org/10.1016/j.procir.2014.06.031.

Le Tohic, C., O'Sullivan, J. J., Drapala, K. P., Chartrin, V., Chan, T., Morrison, A. P., . . . Kelly, A. L. (2018). Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering, 220*, 56-64. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.003.

Lebert, I., Nicolas, C., Portanguen, S. & Lebert, A. (2007). Combined water transfer and bacterial models to predict Listeria innocua growth on the surface of gelatine gel during the drying process. *Journal of Food Engineering, 78*(4), 1371-1381. https://doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.01.009.

Lee, C. P., Karyappa, R. & Hashimoto, M. (2020). 3D printing of milk-based product. *RSC Advances, 10*(50), 29821-29828. https://doi.org/10.1039/d0ra05035k.

Lefèvre, T. & Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate b-lactoglobulin gels. *Biolpolymers, 54*, 578-586. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0282(200012)54:7%3C578::AID-BIP100%3E3.0.CO;2-2.

Levine, H. & Slade, L. (1988). Water as a plasticizer: physico-chemical ,aspects of low-moisture polymeric systems. In F. Franks (Ed.), *Water Science Reviews 3. Water dynamics* (pp. 79-185). Cambridge: Cambridge University Press.

Li, C., Zhu, W., Xue, H., Chen, Z., Chen, Y. & Wang, X. (2015). Physical and structural properties of peanut protein isolate-gum Arabic films prepared by various glycation time. *Food Hydrocolloids, 43*, 322-328. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.003.

Li, H. & Yu, S. J. (2018). Review of pentosidine and pyrraline in food and chemical models: formation, potential risks and determination. *J Sci Food Agric, 98*(9), 3225-3233. https://doi.org/10.1002/jsfa.8853.

Li, S., He, Z., Li, M., Li, R., Lu, J. & Li, H. (2020). A study of the physicochemical properties of rabbit glycated myofibrillary protein with high solubility in low ionic strength medium. *Int J Biol Macromol, 147*, 241-249. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.069.

Li, Y., Xu, Y. & Xu, X. (2022). Continuous cyclic wet heating glycation to prepare myofibrillar protein-glucose conjugates: A study on the structures, solubility and emulsifying properties. *Food Chem, 388*, 133035. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133035.

Liang, Y., Wang, K., Yang, Q., Zhang, L., Shi, C., Tavakoli, S., . . . Hong, H. (2022). The antioxidant activities and flavor properties of glycated bighead carp meat hydrolysates produced with galactose and galacto-oligosaccharides. *Lwt, 158*, 113104. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113104.

Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S. & Sozer, N. (2018). Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 20-27. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034.

Lin, C. (2015). 3D Food Printing: A Taste of the Future. *Journal of Food Science Education, 14*(3), 86-87. https://doi.org/10.1111/1541-4329.12061.

Lindenmeier, M., Faist, V. & Hofmann, T. (2002). Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase i/ii enzyme modulating activity. *J Agric Food Chem, 50*, 6997-7006.

Lipton, J. (2017). Printable food: the technology and its application in human health. *Curr Opin Biotechnol, 44*, 198-201. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.015.

Lipton, J., Cutler, M., Nigl, F., Cohen, D. & Lipson, H. (2015). Additive manufacturing for the food industry. *Trends in Food Science & Technology, 43*(1), 114-123. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.004.

Liu, J., Ru, Q. & Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International, 49*(1), 170-183. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.034.

Liu, L., Li, X., Du, L., Zhang, X., Yang, W. & Zhang, H. (2019). Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose. *Lwt, 109*, 130-136. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.015.

Liu, L., Lin, W.-J., Liu, H.-Z., Shi, A.-M., Hu, H., Nasir, M. N., . . . Wang, Q. (2017). Effect of xylose on the structural and physicochemical properties of peanut isolated protein based films. *RSC Advances, 7*(83), 52357-52365. https://doi.org/10.1039/c7ra07381j.

Liu, L., Meng, Y., Dai, X., Chen, K. & Zhu, Y. (2019). 3D Printing Complex Egg White Protein Objects: Properties and Optimization. *Food and Bioprocess Technology, 12*(2), 267-279. https://doi.org/10.1007/s11947-018-2209-z.

Liu, P., Wang, S., Zhang, H., Wang, H. & Kong, B. (2019). Influence of glycated nitrosohaemoglobin prepared from porcine blood cell on physicochemical properties, microbial growth and flavour formation of Harbin dry sausages. *Meat Science, 148*, 96-104. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.008.

Liu, R., Zhao, S.-m., Yang, H., Li, D.-d., Xiong, S.-b. & Xie, B.-j. (2011). Comparative study on the stability of fish actomyosin and pork actomyosin. *Meat Science, 88*(2), 234-240. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.026.

Liu, Y., Liang, X., Saeed, A., Lan, W. & Qin, W. (2019). Properties of 3D printed dough and optimization of printing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 54*, 9-18. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.008.

Liu, Y., Liu, D., Wei, G., Ma, Y., Bhandari, B. & Zhou, P. (2018). 3D printed milk protein food simulant: Improving the printing performance of milk protein concentration by incorporating whey protein isolate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 49*, 116-126. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.018.

Liu, Y., Sakai, S. & Taya, M. (2012). Production of endothelial cell-enclosing alginate-based hydrogel fibers with a cell adhesive surface through simultaneous cross-linking by horseradish peroxidase-catalyzed reaction in a hydrodynamic spinning process. *J Biosci Bioeng, 114*(3), 353-359. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.018.

Liu, Y., Yu, Y., Liu, C., Regenstein, J., Liu, X. & Zhou, P. (2019). Rheological and mechanical behavior of milk protein composite gel for extrusion-based 3D food printing. *Lwt, 102*, 338-346. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.053.

Liu, Z., Chen, H., Zheng, B., Xie, F. & Chen, L. (2020). Understanding the structure and rheological properties of potato starch induced by hot-extrusion 3D printing. *Food Hydrocolloids, 105*, 105812. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105812.

Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B. & Wang, Y. (2017). 3D printing: Printing precision and application in food sector. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 83-94. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.018.

Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B. & Yang, C. (2018). Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 76-82. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.017.

Liu, Z., Zhang, M. & Yang, C.-h. (2018). Dual extrusion 3D printing of mashed potatoes/strawberry juice gel. *Lwt, 96*, 589-596. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.014.

Longman, L., Highman, S., Bucknall, R., Kaye, S., Edgar, W. & Field, E. (1997). Signs and symptoms in patients with salivary gland hypofunction. *Postgraduate Medical Journal*, 73, 93-97.

Luevano-Contreras, C., Gomez-Ojeda, A., Macias-Cervantes, M. H. & Garay-Sevilla, M. E. (2017). Dietary Advanced Glycation End Products and Cardiometabolic Risk. *Curr Diab Rep, 17*(8), 63. https://doi.org/10.1007/s11892-017-0891-2.

Lupton, D. (2017). 'Download to delicious': Promissory themes and sociotechnical imaginaries in coverage of 3D printed food in online news sources. *Futures, 93*, 44-53. https://doi.org/10.1016/j.futures.2017.08.001.

Lupton, D. & Turner, B. (2016). 'Both Fascinating and Disturbing': Consumer Responses to 3D Food Printing and Implications for Food Activism. In K. E. Tanja Schneider, Catherine Dolan and Stanley Ulijaszek (Ed.), *Digital Food Activism* (p. 17). London: Routledge.

Lv, Y., Lv, W., Li, G. & Zhong, Y. (2023). The research progress of physical regulation techniques in 3D food printing. *Trends in Food Science & Technology, 133*, 231-243. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.004.

Lysik, D., Niemirowicz-Laskowska, K., Bucki, R., Tokajuk, G. & Mystkowska, J. (2019). Artificial Saliva: Challenges and Future Perspectives for the Treatment of Xerostomia. *Int J Mol Sci*, 20(13). https://doi.org/10.3390/ijms20133199.

Ma, F., Li, X., Ren, Z., Sarkka-Tirkkonen, M., Zhang, Y., Zhao, D. & Liu, X. (2021). Effects of concentrations, temperature, pH and co-solutes on the rheological properties of mucilage from Dioscorea opposita Thunb. and its antioxidant activity. *Food Chem*, 360, 130022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130022.

Machida, N., Tohara, H., Hara, K., Kumakura, A., Wakasugi, Y., Nakane, A. & Minakuchi, S. (2017). Effects of aging and sarcopenia on tongue pressure and jaw-opening force. *Geriatr Gerontol Int, 17*(2), 295-301. https://doi.org/10.1111/ggi.12715.

Mantihal, S., Prakash, S. & Bhandari, B. (2019). Textural modification of 3D printed dark chocolate by varying internal infill structure. *Food Res Int, 121*, 648-657. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.034.

Mantihal, S., Prakash, S. & Bhandari, B. (2019). Texture-modified 3D printed dark chocolate: Sensory evaluation and consumer perception study. *J Texture Stud*, 1-14. https://doi.org/10.1111/jtxs.12472.

Mantihal, S., Prakash, S., Godoi, F. & Bhandari, B. (2017). Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 44*, 21-29. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.012.

Mantihal, S., Prakash, S., Godoi, F. C. & Bhandari, B. (2019). Effect of additives on thermal, rheological and tribological properties of 3D printed dark chocolate. *Food Research International, 119*, 161-169. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.056.

Mao, L., Ma, L., Fu, Y., Chen, H., Dai, H., Zhu, H., . . . Zhang, Y. (2022). Transglutaminase modified type A gelatin gel: The influence of intra-molecular and inter-molecular cross-linking on structure-properties. *Food Chem, 395*, 133578. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133578.

Marcinkowska-Gapinska, A., Linkowska-Swidzinska, K., Swidzinski, T. & Surdacka, A. (2018). Rheological parameters of saliva in comparison with taste examination. *Biorheology, 55*(1), 51-60. https://doi.org/10.3233/BIR-180171.

Marko, D., Habermeyer, M., Kemény, M., Weyand, U., Niederberger, E., Frank, F. & Hofmann, T. (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. *Chem. Res. Toxicol., 16*, 48-55.

Martin, A. (2008). L'encadrement réglementaire des aliments fonctionnels. *Médecine des Maladies Métaboliques, 2*(4), 343-347. https://doi.org/10.1016/s1957-2557(08)74031-8.

Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H. & Sepulveda, D. R. (2014). Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – Maltodextrin conjugates. *Food Hydrocolloids, 38*, 110-118. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.006.

Masbernat, L. (2021). Mise au point de matériaux alimentaires imprimables en 3D permettant la création de recettes innovantes. (Vol. PhD, p. 251): Université Paris-Saclay.

Matsudomi, N., Nakano, K., Soma, A. & Ochi, A. (2002). Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the maillard reaction. *J Agric Food Chem, 50*, 4113-4118. https://doi.org/10.1021/jf0114334.

Mazza, G. & Biliaderis, C. G. (1989). Functional Properties of Flax Seed Mucilage. *Journal of Food Science, 54*(5), 1302-1305. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05978.x.

Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J. & Hutmacher, D. W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science, 37*(8), 1079-1104. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007.

Meteyer, S., Xu, X., Perry, N., & Zhao, Y. F. (2014). Energy and Material Flow Analysis of Binder-jetting Additive Manufacturing Processes. *Procedia CIRP*, 15, 19-25. https://doi.org/10.1016/j.procir.2014.06.030.

Meyer, V. (2006). De l'utilité des recherches-actions en SIC. *Communication & Organisation, 30*, 89-108. https://doi.org/https://doi.org/10.4000/communicationorganisation.3455.

Meyer, V. (2011). Des régimes au(x) passé(s) : une communication du sensible. : Editions Erès.

Michon, C., Cuvelier, G., Relkin, P. & Launay, B. (1997). Influence of thermal history on the stability of gelatin gels. *Int J Biol Macromol, 20*, 259-264.

Moerbeek, H. & Casimir, G. (2005). Gender differences in consumers' acceptance of genetically modified foods. *International Journal of Consumer Studies, 29*(4), 308-318. https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2005.00441.x.

Mora, B., Curti, E., Vittadini, E., & Barbanti, D. (2011). Effect of different air/steam convection cooking methods on turkey breast meat: physical characterization, water status and sensory properties. Meat Sci, 88(3), 489-497. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.033.

Morales-Bozo, I., Ortega-Pinto, A., Rojas Alcayaga, G., Aitken Saavedra, J. P., Salinas Flores, O., Lefimil Puente, C., . . . Urzua Orellana, B. (2017). Evaluation of the effectiveness of a chamomile (Matricaria chamomilla) and linseed (Linum usitatissimum) saliva substitute in the relief of xerostomia in elders. *Gerodontology, 34*(1), 42-48. https://doi.org/10.1111/ger.12220.

Movasaghi, Z., Rehman, S. & Rehman, I. U. (2007). Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews, 42*(5), 493-541. https://doi.org/10.1080/05704920701551530.

Movasaghi, Z., Rehman, S. & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews, 43*(2), 134-179. https://doi.org/10.1080/05704920701829043.

Munaz, A., Vadivelu, R. K., St. John, J., Barton, M., Kamble, H. & Nguyen, N.-T. (2016). Three-dimensional printing of biological matters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 1*(1), 1-17. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2016.04.001.

Murphy, S. V., Skardal, A. & Atala, A. (2013). Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J Biomed Mater Res A, 101*(1), 272-284. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34326.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. & Duodu, K. G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus). *Food Chemistry, 86*(3), 325-332. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038.

N'Gom, P. I. & Woda, A. (2002). Influence of impaired mastication on nutrition. *The journal of prosthetic dentistry, 87*(6), 668-673.

Nagaya, M., Kachi, T., Yamada, T. & Sumi, Y. (2004). Videofluorographic observations on swallowing in patients with dyphagia due to neurodegenerative diseases. *J Med Sci, 67*, 17-23.

Netter, A. B., Goudoulas, T. B. & Germann, N. (2020). Effects of Bloom number on phase transition of gelatin determined by means of rheological characterization. *Lwt, 132*, 109813. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109813.

Neyraud, E., Peyron, M. A., Vieira, C. & Dransfield, E. (2005). Influence of bitter taste on mastication pattern. *J Dent Res, 84*(3), 250-254.

Nijdam, J. J., LeCorre-Bordes, D., Delvart, A. & Schon, B. S. (2021). A rheological test to assess the ability of food inks to form dimensionally stable 3D food structures. *Journal of Food Engineering, 291*, 110235. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110235.

Nooshkam, M., Varidi, M. & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food Res Int, 131*, 109003.

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109003.

Offer, G. & Trinick, J. (1983). On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science, 8*, 245-281. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0309-1740(83)90013-x.

Oliver, C. M., Melton, L. D. & Stanley, R. A. (2006). Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46*(4), 337-350. https://doi.org/10.1080/10408690590957250.

OMS. (2022). Santé bucco-dentaire. Retrieved from: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/oral-health.

OMS. (2023). Vieillissement. Retrieved from: https://www.who.int/fr/health-topics/ageing#tab=tab_1.

Oyinloye, T. M. & Yoon, W. B. (2021). Stability of 3D printing using a mixture of pea protein and alginate: Precision and application of additive layer manufacturing simulation approach for stress distribution. *Journal of Food Engineering, 288*, 110127. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110127.

ÖZer, B. H. & Kirmaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology, 63*(1), 1-15. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00547.x.

Park, J., Choi, J., Shim, J., Lee, J., Park, H., Kim, S., . . . Cho, D. (2014). A comparative study on collagen type I and hyaluronic acid dependent cell behavior for osteochondral tissue bioprinting. *Biofabrication, 6*(3). https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035004.

Park, J. W., Lee, S. H., Kim, H. W. & Park, H. J. (2023). Application of extrusion-based 3D food printing to regulate marbling patterns of restructured beef steak. *Meat Sci, 202*, 109203. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109203.

Peng, L., Wang, H., Dai, H., Fu, Y., Ma, L., Zhu, H., . . . Zhang, Y. (2021). Preparation and characterization of gelatin films by transglutaminase cross-linking combined with ethanol precipitation or Hofmeister effect. *Food Hydrocolloids, 113*, 106421. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106421.

Peng, T. (2016). Analysis of Energy Utilization in 3D Printing Processes. *Procedia CIRP, 40*, 62-67. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.01.055.

Pérez-Orozco, J. P., Sánchez-Herrera, L. M. & Ortiz-Basurto, R. I. (2019). Effect of concentration, temperature, pH, co-solutes on the rheological properties of Hyptis suaveolens L. mucilage dispersions. *Food Hydrocolloids, 87*, 297-306. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.004.

Perez, B., Nykvist, H., Brogger, A. F., Larsen, M. B. & Falkeborg, M. F. (2019). Impact of macronutrients printability and 3D-printer parameters on 3D-food printing: A review. *Food Chem, 287*, 249-257. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.090.

Peyron, M. A., Blanc, O., Lund, J. P. & Woda, A. (2004). Influence of age on adaptability of human mastication. *J Neurophysiol, 92*(92), 773-779. https://doi.org/10.1152/jn.01122.2003.

Peyron, M. A., Lassauzay, C. & Woda, A. (2002). Effects of increased hardness on jaw movement and muscle activity during chewing of visco-elastic model foods. *Exp Brain Res, 142*(1), 41-51. https://doi.org/10.1007/s00221-001-0916-5.

Peyron, M. A., Sante-Lhoutellier, V., Francois, O. & Hennequin, M. (2018). Oral declines and mastication deficiencies cause alteration of food bolus properties. *Food Funct, 9*(2), 1112-1122. https://doi.org/10.1039/c7fo01628j.

Peyron, M. A., Sayd, T., Sicard, J., Mirade, P. S., Pinguet, J., Chambon, C. & Sante-Lhoutellier, V. (2021). Deciphering the protein digestion of meat products for the elderly by in vitro food oral processing and gastric dynamic digestion, peptidome analysis and modeling. *Food Funct, 12*(16), 7283-7297. https://doi.org/10.1039/d1fo00969a.

Peyron, M. A., Woda, A., Bourdiol, P. & Hennequin, M. (2017). Age-related changes in mastication. *J Oral Rehabil, 44*(4), 299-312. https://doi.org/10.1111/joor.12478.

Piaton, S., Duconseille, A., Roger-Leroi, V. & Hennequin, M. (2021). Could the use of saliva substitutes improve food oral processing in individuals with xerostomia? A systematic review. *J Texture Stud, 52*(3), 278-293. https://doi.org/10.1111/jtxs.12591.

Polachini, T. C., Basso, R. C. & Telis-Romero, J. (2017). Rheology and Fluid Dynamic of Egg White: Effect of Thixotropy on Engineering Design. *Journal of Food Process Engineering, 40*(1). https://doi.org/10.1111/jfpe.12277.

Polyak, F. & Reich, G. (2019). Infrared spectroscopic study of the coil-helix transition of highly concentrated gelatin formulations. *Eur J Pharm Biopharm, 140*, 11-19. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.010.

Portanguen, S., Dumoulin, C., Duconseille, A., Meurillon, M., Sicard, J., Théron, L., . . . Astruc, T. (2023). Impact of water content and bloom index on gelatin glycation. *Food Hydrocolloids, 145*. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109096.

Portanguen, S., Tournayre, P., Gibert, P., Leonardi, S., Astruc, T. & Mirade, P. S. (2022). Development of a 3D printer for the manufacture of functional food protein gels. *Foods*(11), 458. https://doi.org/doi.org/10.3390/foods11030458.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T. & Mirade, P.-S. (2019). Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends in Food Science & Technology, 86*, 188-198. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.023.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T. & Mirade, P. (2022). 3D food printing: Genesis, trends and prospects. In R. Bhat (Ed.), *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges* (p. 18).

Portier, F. (2016). Biomatériaux collagène/gélatine - Des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides. (Vol. PhD, p. 270): Université Pierre et Marie Curie.

Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bugel, S., Nielsen, J., . . . Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol, 60*, 10-37. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.052.

Prinz, J. & Lucas, P. (1997). An optimization model for mastication and swallowing in mammals. *Proceedings of the Royal Society B*, 264, 1715-1721.

Pulidori, E., Micalizzi, S., Koutsomarkos, N., Bramanti, E., Tinè, M. R., Vozzi, G., . . . Duce, C. (2023). Analysis of gelatin secondary structure in gelatin/keratin-based biomaterials. *Journal of Molecular Structure, 1279*, 134984. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.134984.

Purslow, P. P., Oiseth, S., Hughes, J. & Warner, R. D. (2016). The structural basis of cooking loss in beef: Variations with temperature and ageing. *Food Res Int, 89*(Pt 1), 739-748. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.010.

Qiao, D., Huang, Y., Zhao, G., Zhang, Y., Hou, X., Zhang, B. & Jiang, F. (2023). Small and large oscillatory shear behaviors of gelatin/starch system regulated by amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids, 142*. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108780.

Ramasamy, R., Yan, S. F. & Schmidt, A. M. (2011). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1243*, 88-102. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x.

Rando, P. & Ramaioli, M. (2021). Food 3D printing: Effect of heat transfer on print stability of chocolate. *Journal of Food Engineering, 294*, 110415. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110415.

Rather, J. A., Akhter, N., Ashraf, Q. S., Mir, S. A., Makroo, H. A., Majid, D., . . . Dar, B. N. (2022). A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life, 34*, 100945. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945.

Rather, J. A., Majid, S. D., Dar, A. H., Amin, T., Makroo, H. A., Mir, S. A., . . . Dar, B. N. (2022). Extraction of Gelatin From Poultry Byproduct: Influence of Drying Method on Structural, Thermal, Functional, and Rheological Characteristics of the Dried Gelatin Powder. *Frontiers in Nutrition, 9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.895197.

Ravichandran, G., Lakshmanan, D. K., Raju, K., Elangovan, A., Nambirajan, G., Devanesan, A. A. & Thilagar, S. (2019). Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: An emerging threat to contemporary and future generation. *Environ Int, 123*, 486-500. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.032.

Reeve, P. & Amigoni, S. (2008). La rhéologie ,un outil précieux pour la formulation cosmétique. *L'actualité chimique, 323-324*, 89-99.

Rejeski, D., Zhao, F. & Huang, Y. (2018). Research needs and recommendations on environmental implications of additive manufacturing. *Additive Manufacturing, 19*, 21-28. https://doi.org/10.1016/j.addma.2017.10.019.

Roberfroid, M. B. (2000). A european consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition, 16*(7/8), 689-691.

Roy, A., Carpentier, P., Bourgeois, D. & Field, M. (2010). Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Photochem Photobiol* Sci, 9(10), 1342-1350. https://doi.org/10.1039/c0pp00141d.

Saffel-Shrier, S., Johnson, M. A. & Francis, S. L. (2019). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics and the Society for Nutrition Education and Behavior: Food and Nutrition Programs for Community-Residing Older Adults. *J Nutr Educ Behav, 51*(7), 781-797. https://doi.org/10.1016/j.jneb.2019.03.007.

Sapna, I. & Jayadeep, A. (2023). Transformation of endoxylanase treated red rice bran into a potential ready-to-use functional food ingredient through drum drying: Impact on physicochemical, nutraceutical, storage, and product forming properties. *Journal of Cereal Science*, 103640. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103640.

Schiell, C., Portanguen, S., Scislowski, V., Astruc, T. & Mirade, P. S. (2023). Investigation into the physicochemical and textural properties of an iron-rich 3D-printed hybrid food. *Foods, 12*, 1375-1391. https://doi.org/10.3390/foods12071375.

Schiffman, S. S. (1997). Taste and smell losses in normal aging and disease. *JAMA, 278*(16), 1357-1362.

Schillaci, E., Gràcia, A., Capellas, M. & Rigola, J. (2022). Numerical modeling and experimental validation of meat burgers and vegetarian patties cooking process with an innovative IR laser system. *Journal of Food Process Engineering*. https://doi.org/10.1111/jfpe.14097.

Schimmel, M., Christou, P., Miyazaki, H., Halazonetis, D., Herrmann, F. R. & Muller, F. (2015). A novel colourimetric technique to assess chewing function using two-coloured specimens: Validation and application. *J Dent, 43*(8), 955-964. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.06.003.

Schmidt, F. N., Zimmermann, E. A., Campbell, G. M., Sroga, G. E., Puschel, K., Amling, M., . . . Busse, B. (2017). Assessment of collagen quality associated with non-enzymatic cross-links in human bone using Fourier-transform infrared imaging. *Bone, 97*, 243-251. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.015.

Schneider, A. A., Bu, F. & Ismail, B. P. (2023). Enhancement of pea protein solubility and thermal stability for acidic beverage applications via endogenous Maillard-induced glycation and chromatography purification. *Curr Res Food Sci, 6*, 100452. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100452.

Schramm, G. (1981). Introduction à la viscosité pratique. Gebruder Haake Gmbh.

Schreuders, F. K. G., Schlangen, M., Kyriakopoulou, K., Boom, R. M. & van der Goot, A. J. (2021). Texture methods for evaluating meat and meat analogue structures: A review. *Food Control, 127*, 108103. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108103.

Sebekova, K., Faist, V., Hofmann, T., Schinzel, R. & Heidland, A. (2003). Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *Am J Kidney Dis, 41*(3 Suppl 1), S48-51. https://doi.org/10.1053/ajkd.2003.50084.

Serdeczny, M. P., Comminal, R., Mollah, M. T., Pedersen, D. B. & Spangenberg, J. (2020). Numerical modeling of the polymer flow through the hot-end in filament-based material extrusion additive manufacturing. *Additive Manufacturing, 36*, 101454. https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101454.

Serdeczny, M. P., Comminal, R., Pedersen, D. B. & Spangenberg, J. (2019). Numerical simulations of the mesostructure formation in material extrusion additive manufacturing. *Additive Manufacturing, 28*, 419-429. https://doi.org/10.1016/j.addma.2019.05.024.

Severini, C. & Derossi, A. (2016). Could the 3D Printing Technology be a Useful Strategy to Obtain Customized Nutrition? *J Clin Gastroenterol, 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015*, S175-S178. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000705.

Severini, C., Derossi, A. & Azzollini, D. (2016). Variables affecting the printability of foods: Preliminary tests on cereal-based products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 38*, 281-291. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.001.

Severini, C., Derossi, A., Ricci, I., Caporizzi, R. & Fiore, A. (2018). Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *Journal of Food Engineering, 220*, 89-100. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.025.

Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B. & Raina, S. (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol, 52*(12), 7561-7576. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1851-y.

Shearer, A. E. H. & Davies, C. G. A. (2005). Physicochemical Properties of Freshly Baked and Stored Whole-Wheat Muffins with and without Flaxseed Meal. *Journal of Food Quality*, 28(2), 137-153. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00004.x.

Shimizu, S., Fujii, H. T., Sato, Y. S., Kokawa, H., Sriraman, M. R., & Babu, S. S. (2014). Mechanism of weld formation during very-high-power ultrasonic additive manufacturing of Al alloy 6061. Acta Materialia, 74, 234-243. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2014.04.043.

Siegrist, M. & Sutterlin, B. (2017). Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat. *Appetite, 113*, 320-326. https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.03.019.

Singer, F. A. W., Taha, F. S., Mohamed, S. S., Gibriel, A. & El-Nawawy, M. (2011). Preparation of mucilage/protein products from flaxseed. *American Journal of Food Technology, 6*(4), 260-278.

Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. (2010). Inkjet printing-process and its applications. *Adv Mater, 22*(6), 673-685. https://doi.org/10.1002/adma.200901141.

Sinha, S. & Manthey, F. A. (2008). Semolina and Hydration Level during Extrusion Affect Quality of Fresh Pasta Containing Flaxseed Flour. *Journal of Food Processing and Preservation, 32*(4), 546-559. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00195.x.

Singh, S., Ramakrishna, S., & Singh, R. (2017). Material issues in additive manufacturing: A review. Journal of Manufacturing Processes, 25, 185-200. https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2016.11.006.

Smith, C., Christian, J., Warren, W. & Williams, S. (2007). Characterizing environmental factors that impact the viability of tissue-engineered constructs fabricated by a direct-write bioassembly tool. *Tissue Engineering, 13*(2), 373-383.

Smith, C., Stone, A., Parkhill, R., Stewart, R., Simpkins, M., Kachurin, A., . . . Williams, S. (2004). Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering, 10*(9-10), 1566-1576.

Smith, P. K., Masilamani, M., Li, X. M. & Sampson, H. A. (2017). The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. *J Allergy Clin Immunol, 139*(2), 429-437. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.040.

Somjid, P., Panpipat, W., Cheong, L.-Z. & Chaijan, M. (2022). Comparative Effect of Cricket Protein Powder and Soy Protein Isolate on Gel Properties of Indian Mackerel Surimi. *Foods, 11*(21), 3445. https://doi.org/10.3390/foods11213445.

Springinsfeld, F. (2009). Mécanismes de gélification et comportement rhéologique d'émulsions d'alcanes partiellement cristallisés. (Vol. PhD, p. 217): Université Pierre et Marie Curie – Paris VI.

Stevenson, M., Long, J., Guerrero, P., de la Caba, K., Seyfoddin, A. & Etxabide, A. (2019). Development and characterization of ribose-crosslinked gelatin products prepared by indirect 3D printing. *Food Hydrocolloids, 96*, 65-71. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.018.

Stevenson, M., Long, J., Seyfoddin, A., Guerrero, P., de la Caba, K. & Etxabide, A. (2020). Characterization of ribose-induced

crosslinking extension in gelatin films. *Food Hydrocolloids, 99*, 105324. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105324.

Sun, J., Mu, Y., Liu, T., Jing, H., Obadi, M., Yang, Y., . . . Xu, B. (2021). Evaluation of glycation reaction of ovalbumin with dextran: Glycation sites identification by capillary liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem, 341*(Pt 1), 128066. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128066.

Sun, J., Peng, Z., Yan, L., Fuh, J. Y. H. & Hong, G. S. (2015). 3D food printing—An innovative way of mass customization in food fabrication. *International Journal of Bioprinting, 1*(1), 27-38. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18063/IJB.2015.01.006.

Sun, J., Peng, Z., Zhou, W., Fuh, J. Y. H., Hong, G. S. & Chiu, A. (2015). A Review on 3D Printing for Customized Food Fabrication. *Procedia Manufacturing, 1*, 308-319. https://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.09.057.

Sun, J., Zhou, W., Huang, D., Fuh, J. Y. H. & Hong, G. S. (2015). An Overview of 3D Printing Technologies for Food Fabrication. *Food and Bioprocess Technology, 8*(8), 1605-1615. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1528-6.

Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D. & Lin, L.-y. (2018). Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *Journal of Food Engineering, 220*, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.028.

Sun, Y., Hayakawa, S. & Iszumori, K. (2004). Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the maillard reaction: Effect on protein structure and gel properties. *J. Agric. Food Chem., 52*, 1293-1299.

Sylvester, M. F., Yanns, I., Salzman, E. W. & Forbes, M. J. (1989). Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. *Thrombosis research, 55*, 135-148.

Syrovy, I. (1994). Glycation of albumin: reaction with glucose, fructose, galactose, ribose or glyceraldehyde measured using four methods. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 28*, 115-121.

Tada, A. & Miura, H. (2014). Systematic review of the association of mastication with food and nutrient intake in the independent elderly. *Arch Gerontol Geriatr, 59*(3), 497-505. https://doi.org/10.1016/j.archger.2014.08.005.

Taghavi, F., Habibi-Rezaei, M., Amani, M., Saboury, A. A. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). The status of glycation in protein aggregation. *Int J Biol Macromol, 100*, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.085.

Takeuchi, M., Takino, J., Furuno, S., Shirai, H., Kawakami, M., Muramatsu, M., . . . Yamagishi, S. (2015). Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan. *PLoS One, 10*(3), e0118652. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118652.

Tanaka, M., Kunisaki, N. & Ishizaki, S. (1999). Improvement of Emulsifying and Antibacterial Properties of Salmine by the Maillard Reaction with Dextran. *Fisheries science, 65*(4), 623-628. https://doi.org/10.2331/fishsci.65.623.

Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B. & Eikenberry, E. F. (1988). Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J. Mol. Biol., 203*, 495-505.

Thakur, M. & Modi, V. K. (2020). *Emerging technologies in food science - Focus on the developing world.*: Springer.

Thakur, R., Yadav, B. K. & Goyal, N. (2023). An Insight into Recent Advancement in Plant- and Algae-Based Functional Ingredients in 3D Food Printing Ink Formulations. *Food and Bioprocess Technology*. https://doi.org/10.1007/s11947-023-03040-1.

Theron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Venien, A., Peyrin, F., . . . Fernandez, X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck "foie gras". *Meat Sci, 89*(4), 377-383. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.018.

The Nielsen Company « Zoom sur les Millenials ». www.nielsen.com, 2015.

The NPD Group « Millenials : les 18-34 ans redessinent la restauration de demain ». www.npdgroup.fr, 2017.

Thornalley, P. J., Yurek-George, A. & Argirov, O. K. (2000). Kinetics and Mechanism of the Reaction of Aminoguanidine with the alpha-Oxoaldehydes Glyoxal, Methylglyoxal, and 3-Deoxyglucosone under Physiological Conditions. *Biochemical Pharmacology, 60*, 55-65.

Tkaczewska, J., Kulawik, P., Morawska-Tota, M., Zajac, M., Guzik, P., Tota, L., . . . Migdal, W. (2021). Protocol for Designing New Functional Food with the Addition of Food Industry By-Products, Using Design Thinking Techniques-A Case Study of a Snack with Antioxidant Properties for Physically Active People. *Foods, 10*(4). https://doi.org/10.3390/foods10040694.

Tomašević, I., Putnik, P., Valjak, F., Pavlić, B., Šojić, B., Bebek Markovinović, A. & Bursać Kovačević, D. (2021). 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Current Opinion in Food Science, 41*, 138-145. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.015.

Tong, Q., Zhao, W., Guo, T., Wang, D. & Dong, X. (2023). A Study of the Gelatin Low-Temperature Deposition Manufacturing Forming Process Based on Fluid Numerical Simulation. *Foods, 12*(14). https://doi.org/10.3390/foods12142687.

Toniciolli Rigueto, C. V., Rosseto, M., Alessandretti, I., de Oliveira, R., Wohlmuth, D. A. R., Ferreira Menezes, J., . . . Pizzutti, I. R. (2022). Gelatin films from wastes: A review of production, characterization, and application trends in food preservation and agriculture. *Food Res Int*, 162(Pt B), 112114. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112114.

Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci, 70*(3), 493-508. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.021.

Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., . . . Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc, 110*(6), 911-916 e912. https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.018.

Vadukapuram, N., Hall, C., 3rd, Tulbek, M. & Niehaus, M. (2014). Physicochemical Properties of Flaxseed Fortified Extruded Bean Snack. *Int J Food Sci, 2014*, 478018. https://doi.org/10.1155/2014/478018.

Vaez, M., Asgari, M., Hirvonen, L., Bakir, G., Khattignavong, E., Ezzo, M., . . . Bozec, L. (2023). Modulation of the biophysical and biochemical properties of collagen by glycation for tissue engineering applications. *Acta Biomater, 155*, 182-198. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.11.033.

Vancauwenberghe, V., Katalagarianakis, L., Wang, Z., Meerts, M., Hertog, M., Verboven, P., . . . Nicolaï, B. (2017). Pectin based food-ink formulations for 3-D printing of customizable porous food simulants. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 42*, 138-150. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.011.

Vancauwenberghe, V., Verboven, P., Lammertyn, J. & Nicolaï, B. (2018). Development of a coaxial extrusion deposition for 3D printing of customizable pectin-based food simulant. *Journal of Food Engineering, 225*, 42-52. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.01.008.

Varvara, R. A., Szabo, K. & Vodnar, D. C. (2021). 3D Food Printing: Principles of Obtaining Digitally-Designed Nourishment. *Nutrients, 13*(10). https://doi.org/10.3390/nu13103617.

Veyrune, J. L., Lassauzay, C., Nicolas, E., Peyron, M. A. & Woda, A. (2007). Mastication of model products in complete denture wearers. *Arch Oral Biol, 52*(12), 1180-1185. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.04.016.

Villela, S.M.A., Kraiem, H., Bouhaouala-Zahar, B., Bideaux, C., Lara, C. A.A. & Fillaudeau, L. (2020). A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. *Microbiologyopen*, 9(6), 1175-1182. https://doi.org/10.1002/mbo3.1027.

Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., . . . Rayfield, E. J. (2002). Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *PNAS, 99*, 15596-15601.

Vlassara, H. & Striker, G. E. (2011). AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nature Reviews Endocrinology, 7*(9), 526-539. https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.74.

Vlassara, H. & Uribarri, J. (2014). Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep, 14*(1), 453. https://doi.org/10.1007/s11892-013-0453-1.

Wang, C., Li, J., Li, X., Zhang, M., Gu, L., Chang, C., . . . Yang, Y. (2020). Molecular forces and gelling properties of heat-induced gel from egg white protein glycated with isomalto-oligosaccharide. *Food Hydrocolloids, 99*, 105356. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105356.

Wang, C., Ren, X., Su, Y. & Yang, Y. (2018). Application of glycation in regulating the heat-induced nanoparticles of egg white protein. *Nanomaterials, 8*(11). https://doi.org/10.3390/nano8110943.

Wang, H.-D. & Zhang, Y.-Q. (2023). The glycation of silk sericin to enhance its application to functional foods. *Lwt, 173*, 114255. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114255.

Wang, H., Tu, Z. C., Liu, G. X., Liu, C. M., Huang, X. Q. & Xiao, H. (2013). Comparison of glycation in conventionally and microwave-heated ovalbumin by high resolution mass spectrometry. *Food Chem, 141*(2), 985-991. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.045.

Wang, K., Li, Y., Zhang, Y., Huang, M., Xu, X., Ho, H., . . . Sun, J. (2022). Improving physicochemical properties of myofibrillar proteins from wooden breast of broiler by diverse glycation strategies. *Food Chemistry, 382*, 132328. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132328.

Wang, L., Zhang, M., Bhandari, B. & Yang, C. (2018). Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 101-108. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.029.

Wang, M., Lu, X., Zheng, X., Li, W., Wang, L., Qian, Y. & Zeng, M. (2023). Rheological and physicochemical properties of Spirulina platensis residues-based inks for extrusion 3D food printing. *Food Res Int, 169*, 112823. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112823.

Wang, Y., Dong, L., Zhang, Y., Wang, J., Wang, J., Pang, W. & Wang, S. (2021). Effects of Glycated Glutenin Heat-Processing Conditions on Its Digestibility and Induced Inflammation Levels in Cells. *Foods, 10*(6), 1365. https://doi.org/10.3390/foods10061365.

Wang, Y., Wang, L.-J., Li, D., Özkan, N., Chen, X. D. & Mao, Z.-H. (2008). Effect of flaxseed gum addition on rheological properties of native maize starch. *Journal of Food Engineering, 89*(1), 87-92. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.005.

Wegrzyn, T. F., Golding, M. & Archer, R. H. (2012). Food Layered Manufacture: A new process for constructing solid foods. *Trends in Food Science & Technology, 27*(2), 66-72. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.006.

Wei, Q., Liu, T. & Sun, D.-W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology, 82*, 32-45. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.020.

Wei, Y., Han, C. S., Zhou, J., Liu, Y., Chen, L. & He, R. Q. (2012). D-ribose in glycation and protein aggregation. *Biochim Biophys Acta, 1820*(4), 488-494. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.01.005.

Weller, C., Kleer, R. & Piller, F. T. (2015). Economic implications of 3D printing: Market structure models in light of additive

manufacturing revisited. *International Journal of Production Economics, 164*, 43-56. https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2015.02.020.

Wen, Y., Kim, H. W. & Park, H. J. (2022). Effects of transglutaminase and cooking method on the physicochemical characteristics of 3D-printable meat analogs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 81*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103114.

WHO, Beard, J., Officer, A., Cassels, A., Bustreo, F., Worning, A. M. & Asamoa-Baah, A. (2016). Rapport mondial sur le vieillissement et la santé. (p. 296): OMS.

Wlodarczyk-Biegun, M. K. & Del Campo, A. (2017). 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials, 134*, 180-201. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.019.

Woda, A., Foster, K., Mishellany, A. & Peyron, M. A. (2006). Adaptation of healthy mastication to factors pertaining to the individual or to the food. *Physiol Behav, 89*(1), 28-35. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.02.013.

Wu, M., Li, D., Wang, L.-j., Zhou, Y.-g. & Mao, Z.-h. (2010). Rheological property of extruded and enzyme treated flaxseed mucilage. *Carbohydr Polym, 80*(2), 460-466. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.003.

Xu, J., Fan, Y., Liu, H., Liu, Q., Zhamsaranova, S., Kong, B. & Chen, Q. (2023). Improvement of rheological properties and 3D printability of pork pastes by the addition of xanthan gum. *Lwt, 173*, 114325. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114325.

Xu, L., Gu, L., Su, Y., Chang, C., Wang, J., Dong, S., . . . Li, J. (2020). Impact of thermal treatment on the rheological, microstructural, protein structures and extrusion 3D printing characteristics of egg yolk. *Food Hydrocolloids, 100*, 105399. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105399.

Yacoub, R., Nugent, M., Cai, W., Nadkarni, G. N., Chaves, L. D., Abyad, S., . . . Uribarri, J. (2017). Advanced glycation end products dietary restriction effects on bacterial gut microbiota in peritoneal dialysis patients; a randomized open label controlled trial. *PLoS One, 12*(9), e0184789. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184789.

Yang, F., Guo, C., Zhang, M., Bhandari, B. & Liu, Y. (2019). Improving 3D printing process of lemon juice gel based on fluid flow numerical simulation. *Lwt, 102*, 89-99. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.031.

Yang, F., Zhang, M., Bhandari, B. & Liu, Y. (2018). Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *LWT - Food Science and Technology, 87*, 67-76. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.054.

Yang, F., Zhang, M., Prakash, S. & Liu, Y. (2018). Physical properties of 3D printed baking dough as affected by different compositions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 49*, 202-210. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.001.

Yang, G., Tao, Y., Wang, P., Xu, X. & Zhu, X. (2022). Optimizing 3D printing of chicken meat by response surface methodology and genetic algorithm: Feasibility study of 3D printed chicken product. *Lwt*, 112693. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112693.

Yang, L., Yang, M., Xu, J., Nie, Y., Wu, W., Zhang, T., . . . Zhong, J. (2022). Structural and emulsion stabilization comparison of four gelatins from two freshwater and two marine fish skins. *Food Chem, 371*, 131129. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131129.

Yang, M., Liu, J., Yang, X., Li, S., Li, C., Liu, B., . . . Yu, Y. (2021). Effect of glycation degree on the in vitro simulated gastrointestinal digestion: A promising formulation for egg white gel with controlled digestibility. *Food Chem, 349*, 129096. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129096.

Yang, Q., Wang, Y., Yang, M., Liu, X., Lyu, S., Liu, B., . . . Zhang, T. (2022). Effect of glycation degree on the structure and digestion properties of ovalbumin: A study of amino acids and peptides release after in vitro gastrointestinal simulated digestion. *Food Chem, 373*(Pt B), 131331. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131331.

Yongsawatdigul, J. & Park, J. W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. *Food Chemistry, 83*(3), 409-416. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00105-5.

Yoshikawa, M., Yoshida, M., Nagasaki, T., Tanimoto, K., Tsuga, K. & Akagawa, Y. (2006). Influence of aging and denture use on liquid swallowing in healthy dentulous and edentulous older people. *J Am Geriatr Soc, 54*(3), 444-449. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.00619.x.

Yu, B., Wu, W., Wang, B., Zhang, N., Bak, K. H., Soladoye, O. P., . . . Fu, Y. (2022). Maillard-reacted peptides from glucosamine-induced glycation exhibit a pronounced salt taste-enhancing effect. *Food Chemistry, 374*, 131776. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131776.

Yu, T. Y., Morton, J. D., Clerens, S. & Dyer, J. M. (2017). Cooking-Induced Protein Modifications in Meat. *Compr Rev Food Sci Food Saf, 16*(1), 141-159. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12243.

Yun, H.-J., Han, N.-R., An, H.-W., Jung, W.-K., Kim, H.-W. & Lee, S.-G. (2022). Development of an Abalone 3D Food Printing Ink for the Personalized Senior-Friendly Foods. *Foods, 11*(20), 3262. https://doi.org/10.3390/foods11203262.

Zamora, R. & Hidalgo, F. J. (2005). Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit Rev Food Sci Nutr, 45*(1), 49-59. https://doi.org/10.1080/10408690590900117.

Zeleny, P. & Ruzicka, V. (2017). The design of the 3d printer for use in gastronomy. *MM Science Journal*, 1744-1747.

https://doi.org/10.17973/MMSJ.2017_02_2016187.

Zhan, H., Tang, W., Cui, H., Hayat, K., Hussain, S., Tahir, M. U., . . . Ho, C. T. (2020). Formation kinetics of Maillard reaction intermediates from glycine-ribose system and improving Amadori rearrangement product through controlled thermal reaction and vacuum dehydration. *Food Chem, 311*, 125877. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125877.

Zhang, L., Lou, Y. & Schutyser, M. A. I. (2018). 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. *Food Structure, 18*, 14-22. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.10.002.

Zhang, Q., Wang, Y. & Fu, L. (2020). Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf, 19*(5), 2559-2587. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12593.

Zhang, X., Chen, J., Panda, S. & Benjamin, O. (2023). Feasibility analysis of a newly developed multifunctional mastication simulator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 87*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103393.

Zhao, C.-B., Zhou, L.-Y., Liu, J.-Y., Zhang, Y., Chen, Y. & Wu, F. (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on physicochemical characteristics and rheological properties of soy protein/sugar Maillard reaction products. *Journal of Food Science and Technology, 53*(5), 2342-2351. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2206-z.

Zhao, H., Wang, J., Ren, X., Li, J., Yang, Y.-L. & Jin, X. (2018). Personalized food printing for portrait images. *Computers & Graphics, 70*, 188-197. https://doi.org/10.1016/j.cag.2017.07.012.

Zhao, L., Zhang, M., Chitrakar, B. & Adhikari, B. (2020). Recent advances in functional 3D printing of foods: a review of functions of ingredients and internal structures. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-15. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1799327.

Zheng, Z., Zhang, M. & Liu, Z. (2021). Investigation on evaluating the printable height and dimensional stability of food extrusion-based 3D printed foods. *Journal of Food Engineering, 306*, 110636. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110636.

Zhou, P., Mulvaney, S. J. & Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska Pollock Skin Gelatin: A Comparison with Tilapia and Pork Skin Gelatins. *Journal of Food Science, 71*(6), C313-C321. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00065.x.

Zhu, D., Damodaran, S. & Lucey, J. A. (2008). Formation of Whey Protein Isolate (WPI)−Dextran Conjugates in Aqueous Solutions. *J Agric Food Chem, 56*(16), 7113-7118. https://doi.org/10.1021/jf800909w.

Ziolkovska, A. (2012). Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food Hydrocolloids, 26*(1), 197-204. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.022.

Annexes

Les annexes relatives à ce travail de thèse sont divisées en deux catégories :

- Les annexes « Scientifiques » numérotées en fonction des Chapitres auxquelles elles sont liées (S 0.1, S 2.1 à 2.5, S 3.1 et S 4.1) ;

- Les annexes « Valorisations » numérotées V 1 à V 8.

Annexe S 0.1.

Les méthodes d'impression 3D respectant la norme ISO/ASTM52900-15.

A notre connaissance, huit méthodes d'impression 3D respectent cette norme, à savoir :

1) Jet de liant (ou « Binder jetting »)

Ce procédé utilise deux matériaux, une poudre et un liant. Ce dernier, généralement sous forme liquide, sert d'adhésif entre les couches de poudre. Le matériau est déposé par un rouleau permettant d'en contrôler l'épaisseur, puis une tête d'impression dépose le liant, en se déplaçant dans le plan horizontal. Le plateau support de l'objet en construction se déplace selon l'axe z. L'impression polychromatique est possible avec des matériaux tels que les métaux, les polymères ou les céramiques. Le temps de réalisation est toutefois assez long, car un délai de refroidissement est nécessaire, ainsi qu'un post-traitement pour durcir la pièce réalisée (Meteyer, Xu, Perry & Zhao, 2014).

2) Dépôt d'énergie dirigée (ou « Directed energy deposition – DED »)

Il s'agit d'un ensemble de technologies qui procèdent par dépôt de poudre ou de fil métallique fondu sur un support de construction. Une buse de dépôt est montée sur un bras mobile selon 4 ou 5 axes. Le matériau déposé est fondu par un laser, un faisceau d'électrons ou un arc plasma. La DED permet de réaliser des pièces métalliques de grande dimension pour l'aérospatiale, la construction navale, *etc.* Les pièces réalisées avec cette technologie ont une finition grossière qui nécessite un post-traitement, souvent avec une machine à commande numérique pour une mise à la cote et un lissage. Du fait de son principe, cette technologie peut être également utilisée pour réparer et/ou modifier des pièces existantes (Heigel, Michaleris & Reutzel, 2015).

3) Jets de matériaux (ou « Material jetting »)

Cette technique permet de créer des objets, de la même façon qu'avec une imprimante à jet d'encre bidimensionnelle. Le matériau est projeté par une buse sur une plateforme de construction soit de façon continue, soit à la demande. Sur la plateforme, le matériau se solidifie et peut être durci par un laser ultra-violet (UV). Les matériaux utilisés doivent être projetables, les polymères et les cires sont donc privilégiés (Krujatz et al., 2017).

4) Fusion/liaison sur lit de poudre (ou « Powder bed fusion/binding »)

Cet ensemble de techniques utilise un faisceau laser ou un faisceau d'électrons pour agglomérer les particules de poudre du matériau. Elles utilisent un système d'étalement de la poudre sur chaque couche (rouleau, lame…). La poudre subit ensuite un frittage (procédé consistant à chauffer une pièce sans la mener jusqu'à la fusion) à l'aide d'un laser, couche par couche. L'apport en matériau pulvérulent est effectué par un réservoir placé au-dessus du lit de construction. Les procédés SLS (« *Selective Laser Sintering »*) (Huang et al., 2016) et DMLS (« *Direct Metal Laser Sintering »*), qui utilisent cette méthode, diffèrent essentiellement par le matériau utilisé : plastique pour SLS et métal pour DMLS. Le procédé SHS (« *Selective Heat Sintering »*) diffère des précédents car il utilise une tête d'impression chauffée pour fusionner la poudre du matériau. Un post-traitement est nécessaire pour éliminer la poudre en excès et améliorer la résistance des pièces par augmentation de leur densité.

5) Assemblage de feuilles (ou « Sheet lamination »)

Deux technologies coexistent : '*Ultrasonic additive manufacturing*' (UAM) et '*Ultrasonic consolidation*' (UC). Il s'agit de technologies de fabrication additive à basse température consistant en un assemblage de feuilles métalliques, couche par couche, pour obtenir l'objet en 3D. Les feuilles de métal sont pressées les unes sur les autres en même temps que des vibrations ultrasonores sont appliquées de façon continue, provoquant ainsi un soudage des feuilles entre elles. Après plusieurs couches, une machine à commande numérique ('*Computer Numerical Control*' - CNC) est utilisée pour couper la partie excédentaire des feuilles et ainsi ajuster la pièce à la géométrie désirée. A partir d'une épaisseur de 3 à 6 mm, une seconde machine numérique, de taille inférieure à la première, est utilisée pour garantir la tolérance dimensionnelle ainsi que l'état de surface final (Shimizu et al., 2014).

6) Photopolymérisation en cuve (ou « Vat photopolymerization »)

Cette méthode d'I3D regroupe 6 techniques : 1) « *Stereo Lithography Apparatus »* (SLA) qui agit par polymérisation d'une résine sous l'effet d'un laser UV piloté dans le plan horizontal, pour créer une fine couche de la pièce (Singh, Ramakrishna & Singh, 2017) ; 2) « *Digital Light Processing »* (DLP) qui est une technique de photopolymérisation de la résine à l'aide d'un projecteur numérique muni d'une ampoule inactinique rouge. La couche est créée en une seule exposition, ce qui accélère la vitesse de fabrication ; chaque point polymérisé correspond à un pixel (donc à une surface unitaire) de la matrice du projecteur ; 3) « *Continuous Liquid Interface Production »* (CLIP) qui est une technique de stéréo lithographie en continu, utilisant un laser UV et qui présente l'avantage d'être jusqu'à 100 fois plus précise que les autres techniques, grâce au contrôle de l'oxygène apporté lors de la réaction de polymérisation ; 4) « *Digital Light Synthesis »* (DLS) qui utilise la technique CLIP pour l'impression des pièces qui sont ensuite cuites dans un four, de façon à en renforcer la résistance mécanique. Cette technologie permet également la création de pièces isotropes[35], ce qui est rarement le cas avec les autres technologies ; 5) la technique « *Wave Applied Voxel »* (Wav) qui est utilisée pour l'impression de grandes surfaces en industrie, avec une rapidité jusqu'à 24 fois supérieure par rapport aux autres procédés industriels de polymérisation ; et enfin, 6) La technique « *Solid Ground Curing »* (SGC), où une lampe UV est utilisée par durcir chacune des couches. Cette technologie présente l'avantage de ne pas nécessiter de support.

7) Extrusion de matériaux (ou « Material extrusion »)

Cette technologie est la plus communément utilisée, notamment dans le cas des produits alimentaires. Dans cette technologie, nous pouvons distinguer 1) la « *Fused Deposition Modellin »* (FDM) ou « *Fused Filament Fabrication »* (FFF) : développées à la fin des années 90, ces techniques d'impression utilisent un thermoplastique conditionné sous la forme d'un fil enroulé sur une bobine. Ce fil est guidé vers une tête d'impression mobile et chauffée, munie d'une buse calibrée permettant l'extrusion du matériau au fur et à mesure de son déplacement. Le matériau d'impression est ainsi déposé couche par couche sur un plateau (lit), pour la fabrication de l'objet 3D (Huang et al., 2016). Et, 2) « *Robocasting » ou « Direct Ink Writting »* (DIW) : cette technique a été développée aux Etats-Unis, en 1996, pour produire des

[35] En impression 3D, l'isotropie au sein des matériaux est une qualité qui définit l'uniformité de ses propriétés, quelle que soit la direction dans laquelle elles sont mesurées.

objets en céramique. Elle est semblable à la FDM, mais s'en différencie par le fait qu'elle ne repose pas sur la solidification ou le séchage du matériau déposé pour conserver sa forme après extrusion. C'est la forme du matériau au moment de l'extrusion qui crée la couche imprimée. Des opérations de post-traitement doivent être appliquées après l'impression, comme le séchage ou le frittage, afin d'obtenir les propriétés mécaniques désirées. Cette technique est utilisée pour la production d'implants tissulaires biologiquement compatibles.

Annexe S 2.1.

Préparation des gels de gélatine à teneur en eau fixée.

Voici ci-après le mode opératoire relatif à la préparation des gels de gélatine (**Chapitre 2**, section 2.2.2.1).

- Peser la masse de solvant voulue (eau ultrapure ou solution tamponnée) ;
- Verser dans un ballon en verre de 50 mL, puis le fermer *;*
- Mettre le ballon, sous agitation magnétique, dans une étuve thermostatée (température fixée entre 40 et 130°C, selon les expérimentations) ;
- Attendre 10 min (équilibrage de la température) ;
- Peser la quantité de gélatine désirée et la verser dans le ballon, tout en vérifiant l'agitation (attention au risque de blocage dû à la gélatine) ;
- Attendre que la solution soit homogène et à température de l'étuve (environ 10 min) ;
- Peser la quantité de glucide voulue, puis l'ajouter dans le ballon ;
- Démarrer le chronomètre (qui peut être démarré après l'ajout de la gélatine pour les conditions Témoin) ;
- A la fin du temps réactionnel, couler rapidement les gels dans des récipients adaptés (qui dépendent des analyses effectuées). Ces récipients ont été préalablement placés dans un bain de glace pour stopper la réaction ;
- Attendre la prise en masse complète pendant 10 min ;
- Les échantillons peuvent être conservés quelques heures en conditions hermétiques, mais ils doivent être systématiquement analysés/traités dans la journée.

Voici quelques précautions relatives à la préparation des échantillons :

- Décalage de 5 min entre chaque condition pour respecter les durés réactionnelles ;
- Surveiller régulièrement les bouchons dans l'étuve (tendance à la surpression) ;
- Ne pas laisser les échantillons à l'air libre (dessication rapide).

Annexe S 2.2.

Protocole d'hydrolyse enzymatique pour analyse MS/MS.

Dans ce travail de thèse, trois enzymes ont été testées : la trypsine, la chymotrypsine et la collagénase de type I. La quantité d'enzyme est de 2 mg d'enzymes par échantillon.

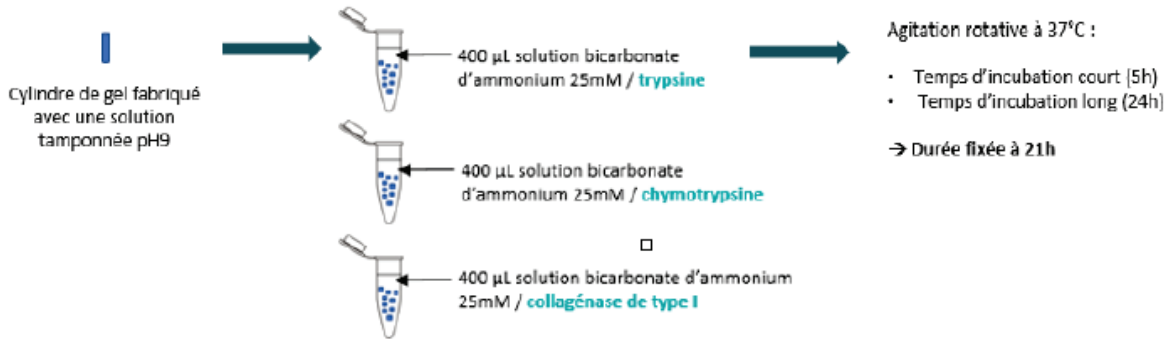


Schéma 2 : Optimisation du protocole d'hydrolyse enzymatique des gels

1) Découper les gels en tronçons sur une plaque de verre à l'aide d'une lame ;
2) Déposer les tronçons d'un cylindre de gel dans un micro-tube de 2 mL ;
3) Ajouter 400 µL de solution de bicarbonate d'ammonium (25 mM)/enzyme ;
4) Mettre sous agitation rotative pendant 21 h à 37 °C.
5) Traitement des échantillons post-hydrolyse.

Après digestion enzymatique, une étape de purification et de concentration protéique est nécessaire en vue de l'analyse des peptides en spectrométrie de masse.

1. Purification protéique

Au cours de cette étape, il convient d'utiliser des colonnes Vivaspins, qui sont des colonnes filtrantes ne laissant passer que les molécules de poids moléculaire > 5 kDa. Avant de les employer, il est nécessaire d'effectuer un lavage avec de l'eau ultrapure.

Mode opératoire :

- Déposer 400 µL d'eau ultrapure au niveau de la colonne ;
- Centrifuger 15 min à 10 000 g ;
- Vider l'eau contenue dans le micro-tube et la colonne ;
- Déposer 400 µL d'échantillon dans la colonne ;
- Centrifuger 2 h à 10 000 g ;

2. Concentration protéique

Cette étape permet de s'affranchir de l'éventuelle présence d'impuretés restant dans l'échantillon. La concentration s'effectue sur des colonnes C18 (Pierce C18 Spin Column). Il s'agit d'une séparation basée l'hydrophobicité des molécules.

Mode opératoire :

- Activation de la colonne (x2) : 200 µL de solution d'activation, centrifugation à 1500 g, pendant 60 s, à 4 °C ;
- Equilibration de la colonne (x2) : 200 µL de solution d'activation, centrifugation 1500 g, pendant 60 s, à 4 °C. ;
- Chargement de l'échantillon (x3) : 50 µL d'échantillon, centrifugation 1500 g, pendant 60 s, à 4 °C ;
- Lavage (x3) : 200 µL de solution d'activation, centrifugation 1500 g, pendant 60 s, à 4 °C ;
- Elution : 20 µL de solution d'activation, centrifugation 1500 g, pendant 60 s, à 4 °C ;
- Séchage.

Annexe S 2.3.

Préparation des échantillons pour dépôt sur plaque Maldi-TOF/TOF.

Mode opératoire :

- Peser 0,2 g de gel pour 1 mL de tampon (w/v : 1/5) ;
- Dénaturation thermique au bain-marie pendant 5 min à 97 °C ;
- Homogénéisation au vibro-broyeur « Retch » à vitesse maximale (30 min à température ambiante) ;
- Centrifugation à 10000 g pendant 10 min à 10 °C ;
- Le culot est jeté, récupérer le surnageant ;
- Dilution au 1/5 du surnageant ;
- Purification sur colonnes C18 (*cf*. **Annexe S 2.2**).

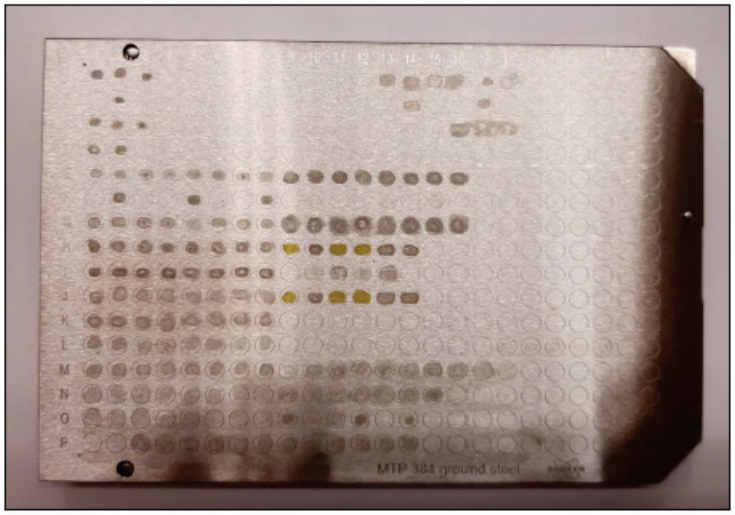
Composition du tampon :

- 40 mM de Tris-HCl pH 8,8 ;
- 2 mM EDTA et inhibiteurs ;
- 0,1 % SDS ;
- 1 % DTT.

A noter que l'EDTA a un effet inhibiteur sur les métalloenzymes, le SDS est un tensioactif et le DDT permet de limiter la formation de ponts disulfures (**Tableau 2.7**).

Dépôt sur plaque Maldi-TOF/TOF :

Après repérage des positions (échantillons et calibrants), 1 µL d'échantillon est déposé sur la cible, puis 1 µL de matrice HCCA.



Plaque de dépôt Maldi-TOF/TOF. Les positions des échantillons et des calibrants peptides sont repérées.

Composition de la matrice HCCA (Acide trifluoroacétique et acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) (Tableau 2.7) :

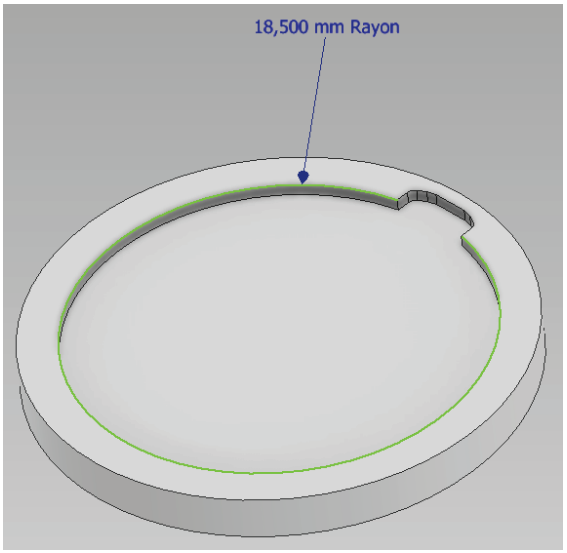
Pour 1 mL de matrice :

- 10 mg d'HCCA ;
- 499 µL d'eau ultra-pure ;
- 400 µL d'acétonitrile ;
- 1 µL de TFA ;
- Passer 5 min aux ultra-sons.

Annexe S 2.4.

Moules pour gels de gélatine conçus par CAO et imprimés en 3D.

Moules pour essais de rhéologie :



Moules Imprimés en 3D en acide polylactique. Destinés aux mesures rhéologiques des gels glyqués et non-glyqués (*cf*. **Chapitre 2**).

Annexe S 2.5.

Préparation d'échantillons pour les observations microscopiques.

1. Cryofixation (pour les analyses FT-IR)

Matériels nécessaires :

- Gants + lunettes de protection
- Azote liquide
- 2-méthylbutane
- Boîte en polystyrène pour l'azote
- Bécher en plastique épais résistant au froid
- Couvercle en aluminium pour le bécher
- Milieu d'enrobage cryogénique (OCT, Dutscher, France)
- Paire de pinces longues

Mode opératoire :

- Remplir le récipient en polystyrène avec de l'azote liquide, mettre le couvercle et placer l'ensemble sous la sorbonne ;
- Remplir le bécher de 2-méthylbutane et le placer dans l'azote. Couvrir le bécher ;
- Attendre 15 min environ que le 2-méthylbutane se refroidisse. De petits cristaux doivent apparaître dans le fond du bécher ;
- Plonger l'échantillon en le tenant avec les pinces (30 s) ;
- Mettre une grosse goutte d'OCT sur la platine du cryostat pour y coller l'échantillon. Faire un tour de colle bien épais tout autour pour s'assurer que l'échantillon ne se décroche pas ;
- Conserver l'échantillon à -20 °C dans le cas de coupes dans un délai court, sinon le placer à -80 °C.

2. Coupes histologiques avec le cryostat Leica (pour les analyses FT-IR)

2.1. Principe de la méthode

Préparer des coupes de tissu (musculaire, organes, gels…) et les fixer sur des lames en vue de colorations pour des caractérisations histologiques.

2.2. Matériels nécessaires

- Plateau porte-lames ;
- Lames en verre Superfrost ou Superfrost +, fenêtres BAF2 (analyses infrarouge) ou silice conformément au type de coloration du protocole ;
- Pointe métallique ;
- Bistouri ;
- Boite à couvercle coiffant.

2.3. Réactifs

- Milieu d'enrobage cryogénique (OCT, Dutscher, France)
- Alcool à 95 %.

2.4. Contraintes de la méthode

- Régler le thermostat du cryostat et du porte-objet à la température d'utilisation (-18/-20 °C). Toutefois, il est possible que certains échantillons, selon leur nature ou le traitement appliqué (très gras, très salés, marinés, cuits…) nécessitent une température inférieure et l'on peut refroidir l'enceinte et le porte-objet à -30 °C et même jusqu'à -50 °C ;
- Le petit matériel (bistouri, pince, pinceaux et pointe) doit être gardé à la température de travail dans l'enceinte du cryostat.

2.5. Mode opératoire

- Régler la température de l'enceinte et du porte-objet du cryostat. S'assurer que les outils soient bien dans l'enceinte pour être à la bonne température ;
- Préparer les lames sur un plateau porte-lames. Prévoir au moins 3 à 4 lames par échantillon et par type de coloration, les identifier au crayon à papier (ne pas utiliser de marqueur qui pourrait polluer les bains de coloration) ;
- Préparer une boite à couvercle coiffant identifiée avec le nom de l'expérimentation et le nom des échantillons ;
- Sortir les échantillons du congélateur à -80 °C un par un, avec la pince les poser dans l'enceinte. Attendre l'équilibre de température ;
- S'assurer que le volant soit bloqué avec le porte-objet en position basse ;
- Coller l'échantillon sur la platine au moyen des pinces avec le milieu de montage (OCT) ;
- Placer la platine sur l'élément Peltier (emplacement d'accélération de refroidissement) et attendre 1 à 2 min. La colle devient blanche ;
- Installer la platine sur le porte-objet de façon à optimiser et sécuriser la coupe ;
- Dégrossir l'échantillon avec des coupes de 20 ou 30 µm avec la lame anti-roll relevée jusqu'à obtenir une surface plane de la taille de la coupe. Veiller à s'assurer de l'orientation souhaitée : coupe transverse ou coupe longitudinale. Coller un spécimen de coupe sur une lame « brouillon » et regarder sous microscope optique pour s'en assurer ;
- Réaliser ensuite 4 à 5 coupes d'épaisseur 10 µm pour les observations histologiques, ou de 6 µm pour les analyses infrarouge (fenêtres BAF2) ;
- Lorsque la coupe est réalisée, soulever délicatement la lame anti-roll et appliquer la lame avec précaution sur la coupe sans pli ni déchirure. La coupe doit être déposée en bas de la lame afin qu'elle puisse être immergée dans le bain de coloration. Toujours coller les coupes sur le recto de la lame (côté étiquette) ;
- Pour des coupes sériées, s'assurer qu'il y ait le moins possible de coupes intermédiaires pour retrouver la même structure musculaire sur toutes les coupes ;

- Laisser déshydrater les coupes sur les lames, posées à plat sur le plateau porte lames, pendant 15 à 60 min selon la température du laboratoire avant de les congeler ;
- Ranger les lames dans une boite à couvercle coiffant, sceller le pourtour de la boite avec un ruban adhésif ;
- Conserver la boîte dans un congélateur à -20 °C. La boîte peut être conservée à +4 °C si la coloration est réalisée dans les 24 h ;
- Retirer l'échantillon de la platine, toujours avec le volant bloqué en position haute, en le posant sur la vitre du cryostat qui est tiède et fait fondre la colle. Agir rapidement pour ne pas décongeler l'échantillon en se servant d'une pince et d'une spatule. Dans l'enceinte, à l'aide d'une pince et du bistouri, retirer le plus d'OCT possible. Replacer l'échantillon dans son contenant et le ranger immédiatement dans sa boîte dans le congélateur -80 °C ;
- En fin d'utilisation, nettoyer le cryostat (volant bloqué) avec les pinceaux, vider le bac des résidus et « aspirer » les poussières restantes avec la buse d'aspiration. Remonter la température de l'enceinte et du porte-objet à -10 °C. Les outils propres doivent être maintenus dans l'enceinte. Penser à éteindre l'éclairage. L'appareil doit rester en veille en permanence.

3. Coupes pour la microscopie électronique à transmission

3.1. Fixation des échantillons[36]

Etape 1 :

Fixation des échantillons (cylindres de L=20mm et D=10 mm) dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% :

Dans chaque tube, verser 2,37 mL de solution de cacodylate à 0,1 M et ajouter 0,125 mL de solution de glutaraldéhyde à 50%.

Couper les cylindres de gel en 2 (dans la hauteur). Mettre 1 moitié de côté pour la cryofixation et couper l'autre moitié en 4 dans le sens de la longueur avant de placer les morceaux dans chaque tube. Laisser les tubes 2 h sur la paillasse avant de les placer à 4 °C pour au moins 2-3 jours. Les échantillons peuvent être conservés ainsi plusieurs jours.

Cette étape permet de fixer les protéines contenues dans les échantillons.

Etape 2 :

Découpe des gels :

Les morceaux de gels fixés au glutaraldéhyde sont découpés en petits cubes d'environ 2 mm de côté, sous loupe binoculaire, pour cibler les zones d'intérêt. Une dizaine de petits cubes est nécessaire. Le reste des échantillons peut rester dans le glutaraldéhyde.

Etape 3 :

Transfert des cubes de gels dans le tampon cacodylate :

Verser environ 3-4 mL de solution de cacodylate à 0,1 M pH 7,4 dans chaque tube. Ajouter les petits cubes précédemment découpés ; ils doivent être immergés pendant 5 min dans la solution en excès.

[36] Toutes les manipulations sont réalisées avec des gants, sous sorbonne.

Celle-ci fait ici office de solution de rinçage. Il est possible de conserver les échantillons quelques jours dans la solution, auquel cas on rajoute du glutaraldéhyde pour obtenir une solution à 0,1% de concentration de manière à s'assurer d'une fixation stable.

Etape 4 :

Fixation dans l'acide osmique :

Etape à réaliser une fois que toute la série d'échantillons transférée dans le cacodylate est prête, car elle nécessite l'utilisation d'ampoules d'osmium (fixation sur protéines et lipides) de 10 mL (limitation du gaspillage).

Préparer la solution d'acide osmique (les ampoules sont à 4 % pour une concentration finale souhaitée de 1%), dilution au ¼ dans du tampon cacodylate à 0,1 M pH 7,4. Aspirer et vider la P5000 à plusieurs reprises pour mélanger la solution). Verser 1 mL de solution d'osmium à 1%. Laisser le tube fermé sur la paillasse pendant 60 min sans dépasser 90 min.

Cette solution permet de fixer les lipides contenus dans l'échantillon (peu présents dans notre cas), et permet d'améliorer le contraste de l'image observée au microscope.

Etapes suivantes :

- Vider l'osmium contenu dans le tube et, verser 1 mL de cacodylate à 0,1 M dans le tube. Attendre 5 min ;
- Vider le tampon dans la poubelle dédiée et verser 1 mL d'eau déminéralisée. Attendre 10 min ;
- Vider l'eau et verser 1 mL d'éthanol à 70° dans le tube. L'échantillon peut se conserver dans cette solution pendant plusieurs jours ;
- Les échantillons doivent ensuite être déshydratés : vider l'éthanol à 70° puis remplir à mi-hauteur d'éthanol à 95° et laisser reposer pendant 20 min. Vider l'éthanol à 95° ;
- Recommencer l'étape précédente ;
- Remplir le tube avec de l'éthanol 100° et laisser de côté 20 min ;
- Recommencer l'étape précédente (déshydratation des échantillons) ;
- Remplir le tube avec la solution d'oxyde de propylène et attendre 20 min ;
- Recommencer l'étape précédente ;
- Préparer le mélange oxyde de propylène/résine[37] (ratio 1/1) : on considère que l'on utilise 3 mL par tube (un catalyseur est ajouté à la résine) ;
- Vider l'oxyde de propylène et ajouter le mélange oxyde/résine à mi-hauteur, il s'agit de l'étape d'imprégnation (60 à 90 min) ;
- Vider le mélange et remplir les tubes de résine à mi-hauteur en essayant d'avoir tous les échantillons au fond du tube. Laisser imprégner pendant 12 h ;
- Avec le reste de la résine, couler les moules destinés aux échantillons (placer des étiquettes papier préalablement numérotées au fond des moules) ;
- Le lendemain : vider les tubes (5 par 5) en les mettant tête en bas dans l'entonnoir du bidon de récupération de la résine (les tubes mettent 5-10 min à se vider).
- Se débarrasser des bulles qui ont pu remonter à la surface, et remettre l'étiquette au fond du moule à l'aide des pinces. Placer 2 échantillons par moule (un de chaque côté de l'étiquette). Les enfoncer

37 Résine époxy TAAB composé de DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride) 25 %, MNA (Nadic Meyhyl Anhydride) 25 %, TAAB embeding 50 % + 2 % de DMP-30 (catalyseur).

légèrement en veillant à ne pas faire de bulles. Veiller également à placer les échantillons de manière à ce que ce qui est écrit sur l'étiquette soit lisible ;
- Placer les moules à l'étuve à 37 °C pendant 2 h (cela va permettre aux bulles de remonter à la surface), puis à 60 °C pendant 72 h.

3.2. Réalisation des coupes

Choisir les blocs de résine contenant les échantillons les mieux positionnés (parallèles à l'extrémité du bloc).

- Limer les 1ères couches de résine jusqu'à proximité de l'échantillon ;
- Fixer le bloc dans le porte-échantillon en limitant le porte-à-faux, serrer avec la clé
- Allumer l'alimentation de l'Ultracut (**Tableau 2.5**) ;
- Placer le porte-échantillon sur la platine verticale ;
- Découper les 4 bords de la résine (en tournant le porte-échantillon) avec une lame de rasoir pour dégager l'échantillon (en forme de pyramide) ;
- Découper l'échantillon, si nécessaire, pour que sa taille ne dépasse pas 1 mm de section ;
- Donner une forme de trapèze à la section de l'échantillon
- Placer le porte-échantillon sur le bras mobile (détrompeur pour le sens du porte-échantillon) ;
- Tourner l'échantillon (mollettes) pour orienter correctement le trapèze (pour les coupes, le couteau doit attaquer le côté large du trapèze en 1er) ;
- Monter un couteau de verre pour arraser la surface de l'échantillon (mode « semi-fine » de l'Ultracut) ;
- Orienter le couteau pour lui donner un angle de 6° (inclinaison vers l'échantillon) ;
- Ajuster l'orientation de l'échantillon en fonction de son orientation par rapport au couteau, doit être quasi parallèle ;
- Avancer le couteau vers l'échantillon par pas de 1 µm (1 tour de manivelle) ou avancer par pas de 2 µm en utilisant en parallèle la molette de gauche ;
- Une fois au contact, faire des coupes de 1 µm jusqu'à obtenir une surface d'échantillon homogène ;
- Changer le couteau, remplacer par un couteau diamant ;
- Repousser le bras mobile vers l'arrière afin de ne pas arriver en butée en cours de réglage ;
- Se remettre au contact de l'échantillon et faire des coupes de 1 µm pour réajuster la surface ;
- Remplir le réservoir du couteau avec de l'eau déminéralisée, ajuster le niveau en fonction de « l'effet miroir » de la surface du liquide. La surface doit apparaître blanche et être affleurante au couteau ;
- Quand les coupes sont propres, passer en mode « Ultra-fines » afin d'obtenir des coupes d'environ 90 nm ;
- Placer des grilles de cuivre dans de l'éthanol pur puis prélever le nombre nécessaire et les faire sécher sur papier filtre ;
- Retirer les coupes inutiles avec une boule de pipette Pasteur en veillant à ne pas toucher le couteau ;
- Si les coupes sont plissées, il est possible de les détendre en passant, au-dessus (à quelques mm), un papier imbibé de toluène (attention aux vapeurs) ;
- Trier les coupes utilisables en fonction de leur couleur. Les couleurs correspondent aux épaisseurs obtenues. Seules les coupes blanches ou jaunes-or sont exploitables ;
- Le tri se fait avec un cil monté sur un morceau de pipette Pasteur avec de la paraffine ;

- Avec une pince fine, plonger une grille dans le réservoir et la placer sous les coupes à récupérer. Remonter la grille en récupérant la coupe comme avec une épuisette. On peut mettre plusieurs coupes sur une même grille en fonction de leurs tailles ;
- Les coupes doivent être placées sur le côté brillant des grilles ;
- Poser la grille dans une boîte, sur papier filtre, en l'inclinant légèrement pour retirer l'eau puis la poser. Laisser sécher avant de refermer la boîte.

N.B. : les coupes semi-fines peuvent aussi être exploitées en microscopie optique :

- Les récupérer (environ 10) avec une boule de pipette Pasteur ;
- Les déposer sur une lame sur laquelle a été déposée une goutte d'eau déminéralisée ;
- Placer une platine chauffante jusqu'à évaporation (permet aussi de détendre les coupes) ;
- Recouvrir de bleu de Toluidine filtré (fixation sur les protéines) ;
- Poser sur la platine chauffante jusqu'à apparition de contours irisés (vert billant). Compter environ 1 min pour cette étape ;
- Retirer l'excès de colorant et rincer à l'eau déminéralisée.

3.3. Coloration/contraste

Le terme de « coloration » est un abus de langage dans ce cas puisqu'il s'agit d'apporter du contraste aux coupes précédemment réalisées par l'utilisation de métaux lourds. Les électrons émis par la source du MET ne traverseront pas ces métaux. Ces métaux ne se fixent pas spécifiquement sur des structures déterminées, cela dépend des interactions mises en jeu. Les mécanismes restent mal connus.

A noter que l'acide osmique, utilisé lors de la fixation des échantillons, a également un rôle de contrastant. Mais, celui-ci est insuffisant pour permettre des observations correctes en MET.

Etape 1 :

1er contrastant

- Choisir 2 grilles pour chaque condition, considérer un volume de contrastant de 500 µL pour 2 grilles (2 grilles par puits) ;
- Préparer, dans un flacon teinté (réactif sensible aux UV), une solution d'acétate d'uranyle : 4,5 mL d'éthanol à 50 % et 7 % d'acétate d'uranyle en poudre (0,315g) ;
- Mettre sous agitation magnétique pendant 10 min ;
- Sous une Sorbonne, aspirer le contenu du flacon avec une seringue, ajouter un filtre (0,45 µm) et déposer environ 500 µL de solution dans n puits d'une plaque en faïence. Recouvrir immédiatement d'un couvercle opaque ;
- A intervalle d'environ 5 min (décalage nécessaire pour les temps de rinçage), déposer 2 grilles du même échantillon dans les puits en veillant à leur immersion complète. Remettre le couvercle (le temps d'immersion ne doit pas dépasser 30 min sinon le contraste est trop important et un précipité peut se former sur les grilles) ;
- Au bout de 25 min d'immersion, en les tenant avec une pince, rincer les grilles avec de l'éthanol 50 % de la façon suivante :
    - Faire couler environ 50 gouttes (avec une pissette) sur la face cuivre de la grille ;
    - 50 gouttes sur l'autre face ;
    - A nouveau 50 gouttes sur la face cuivre ;
    - Rincer la jonction entre la pince et la grille afin d'éliminer les résidus d'acétate d'uranyle.

- Déposer les grilles dans leurs boîtes.

Etape 2 :

2nd contrastant

- Préparation de 2 solutions mères :
  - Nitrate de plomb : 33.12 g /100 mL (solution A) ;
  - Citrate trisodique : 35.71 g /100 mL (solution B).
- Préparation de la solution fille, extemporanément :
  - Solution A : 1 mL ;
  - Ajouter 4 mL d'eau déminéralisée ;
  - Solution B : 1,5 mL ;
  - Ajouter 4 mL d'eau déminéralisée ;
  - Agiter 1 min à la main ;
  - Attendre 30 min ;
  - Ajouter 2 mL de NaOH 1 M ;
- Dans des boîtes de Pétri en verre (compter une boîte pour 3 échantillons), placer des pastilles de soude en quantité (environ la moitié de la boîte). Ces pastilles sont destinées à piéger le CO_2 (pour éviter l'apparition d'un précipité, il est nécessaire de bloquer sa respiration lors de l'ouverture des boîtes) ;
- Déposer 3 gouttes de solution fille à côté des pastilles de soude (si nécessaire, incliner très légèrement la boîte de façon que la solution n'entre pas en contact avec les pastilles) ;
- Déposer les grilles de façon qu'elles flottent à la surface des gouttes (côté cuivre au contact de la goutte) ;
- Décaler les dépôts de 5 min pour pouvoir effectuer les rinçages ;
- Respecter un temps de contact de 20 min ;
- Préparer 5 flacons de 100 mL pour les rinçages :
  - Le 1er contient 2 % de NaOH (2 mL NaOH 1 M qsp 100 mL d'eau déminéralisée) ;
  - Les 4 suivants contiennent uniquement de l'eau déminéralisée (les récipients doivent être bien remplis pour faciliter le trempage).
- Saisir la grille avec une pince en la tenant fermement et la tremper 30 fois dans chaque flacon avec un rythme soutenu (la grille doit être perpendiculaire à la surface du liquide) ;
- Déposer la grille sur papier filtre et laisser sécher.

Annexe S 3.1.

Protocole d'extraction du mucilage à froid.

Ingrédients :

- Graines de lin doré ;
- Eau déminéralisée.

Mode opératoire :

- Peser 30 g de graines de lin dans un bécher de 1000 mL ;
- Ajouter 500 mL d'eau déminéralisée ;
- Remuer quelques secondes et placer 65 h à 4 °C ;
- Traitement par sonication pendant 0, 30 ou 60 min : les béchers sont placés dans un bain à ultra-sons à température ambiante (mode puissance « normal ») ;
- Le prélèvement du mucilage doit se faire sous agitation, la décantation peut provoquer un gradient de concentration.

Conservation :

- Noter la date de préparation sur le bécher ;
- Conserver une semaine à 4 °C.

Annexe S 3.2.

Protocole d'extraction du mucilage à chaud.

Ingrédients :

- Graines de lin doré ;
- Eau déminéralisée.

Mode opératoire :

- Peser 30 g de graines de lin directement dans une casserole ;
- Ajouter 500 mL d'eau déminéralisée ;
- Mettre la casserole sur la plaque induction, régler sur le maximum ;
- Au début de la cuisson, remuer les graines et les décoller du fond de la casserole car elles gonflent et restent collées entre elles, même pendant l'ébullition ;
- Réduire la puissance à 2 et mettre le couvercle de manière qu'il y ait un peu d'air (ne pas fermer complètement car le mucilage monte très rapidement et peut déborder) ;
- Faire bouillir pendant 20 minutes ;
- Verser la préparation dans un bécher au travers d'un chinois en inox ;
- Laisser s'écouler le mucilage et racler de temps en temps le fond du chinois contre les bords du bécher pour bien récupérer le mucilage qui reste accroché ;
- Le prélèvement du mucilage doit se faire sous agitation, la décantation peut provoquer un gradient de concentration.

Conservation :

- Noter la date de préparation sur le bécher ;
- Conserver une semaine à 4 °C.

Annexe S 3.3.

Protocole de broyage des échantillons de viande à l'azote liquide.

Matériels :

- Broyeur à billes double cuve ;
- Cuves et billes en acier inoxydable ;
- Cuves, paniers, pinces ;
- Azote liquide (environ 150 L pour 4 kg d'échantillons) ;
- Gants et lunettes de protection.

Mode opératoire :

- Refroidir les cuves et billes dans l'azote liquide ;
- Placer les cubes de viande dans les cuves (50 g par cuve) et mettre les couvercles ;
- Replacer l'ensemble dans l'azote liquide pendant 60 à 90 s ;
- Placer les cuves dans le broyeur (verrouiller les cuves) ;
- Effectuer un cycle de 3 min de broyage (mouvement vertical) ;
- Récupérer la poudre dans des sacs et les placer sous vide puis à -18 °C.

Annexe S 4.1.

Questionnaires présentés à différents publics.

<u>Lors des journées portes ouvertes du Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes (2019) :</u>

INRA SCIENCE & IMPACT

QUESTIONNAIRE

IMPRESSION 3D ET ALIMENTATION…

La façon de se nourrir évolue avec les générations (habitudes, procédés…), aidez-nous à apprécier cette évolution !!

Merci de nous indiquer votre âge : ____ ans.

1) Connaissez-vous l'impression 3D ? ☐ OUI ☐ NON

2) Connaissez-vous l'impression 3D alimentaire ? ☐ OUI ☐ NON

3) Seriez-vous prêt à manger des aliments imprimés ?
   a. Dans la vie de tous les jours ? ☐ OUI ☐ NON
   b. Dans le cas d'une pathologie ? ☐ OUI ☐ NON

4) Selon vous, un aliment imprimé en 3D peut-il être :
   a. Sain ☐ OUI ☐ NON
   b. Adapté à mes besoins ☐ OUI ☐ NON
   c. Ultra-transformé ☐ OUI ☐ NON
   d. Naturel ☐ OUI ☐ NON
   e. Contre-nature ☐ OUI ☐ NON

5) Les aliments imprimés en 3D peuvent-ils répondre à des problématiques de développement durable ? ☐ OUI ☐ NON

6) Si un scientifique vous dit qu'un aliment imprimé est bon pour votre santé, le croiriez-vous ? ☐ OUI ☐ NON

MERCI DE VOTRE PARTICIPATION !

Et si vous voulez nous dire quelque chose, écrivez-le au verso…

Lors de la présentation de l'I3D alimentaire à l'association « Les gourmets gourmands » (2023) :

IMPRESSION 3D ALIMENTAIRE, VOTRE AVIS NOUS INTERESSE !

Aviez-vous déjà entendu parler d'impression 3D alimentaire ?

□ **Oui**
□ **Non**

Si oui, à quelle occasion ?
(Réponse libre)

Accepteriez-vous de manger des aliments imprimés en 3D ?

□ **Oui**
□ **Non**
□ **Autre :**

Si oui : pour quelle(s) raison(s) consommeriez-vous ce type d'aliments ? (Plusieurs choix possibles)

□ **Pour faciliter la préparation de mes repas**
□ **Pour améliorer mon équilibre alimentaire**
□ **Pour améliorer ma santé ou mon bien-être**
□ **Je suis sensible à l'aspect visuel et/ou à la texture des aliments**
□ **Je teste facilement les innovations**
□ **Je teste facilement les innovations**
□ **Le côté ludique m'intéresse**
□ **Autre :**

Si oui : à quelle occasion consommeriez-vous ce type d'aliments ?
(Plusieurs choix possibles)

□ **Alimentation quotidienne à domicile**
□ **En restauration collective**
□ **Lors de moments de convivialité**
□ **Par curiosité**
□ **Lors d'un traitement médical ou d'un régime**
□ **Lors d'un traitement médical ou d'un régime**
□ **Autre :**

Si non : quel(s) serai(en)t, à priori, le(s) frein(s) à la consommation de ces aliments ?

(Plusieurs choix possibles)

□ **L'aspect visuel et/ ou la texture**
□ **Le goût attendu**
□ **Un manque de diversité des ingrédients**
□ **Une nouvelle technologie (difficultés de mise en œuvre)**
□ **Le prix**
□ **Autre :**

Selon vous, à qui cette technologie pourrait-elle être utile ?
(Plusieurs choix possibles)

□ **Aux enfants et adolescents**
□ **Aux jeunes actifs**
□ **Aux personnes ayant des besoins nutritionnels spécifiques (avec carences, sportifs, femmes enceintes)**
□ **Aux personnes ayant des difficultés à manger (personnes âgées, personnes en situation de handicap…)**
□ **A tout le monde**
□ **Autre :**

Selon vous, à qui serait destiné ce type d'aliments ?
(Plusieurs choix possibles)

□ **Aux enfants et adolescents**
□ **Aux jeunes actifs**
□ **Aux personnes ayant des besoins nutritionnels spécifiques (avec carences, sportifs, femmes enceintes)**
□ **Aux personnes ayant des difficultés à manger (personnes âgées, personnes en situation de handicap…)**
□ **A tout le monde**
□ **Autre :**

Selon, vous, quels seraient les avantages et inconvénients de cette technologie de fabrication d'aliments ?
(Réponse libre)

Quelle est votre catégorie socio-professionnelle ?

□ **Agriculteur**
□ **Artisan/commerçant/chef d'entreprise**
□ **Profession libérale**
□ **Cadre ou profession intellectuelle supérieure**
□ **Profession intermédiaire**
□ **Employé**

□ **Ouvrier**
□ **Retraité**
□ **Demandeur d'emploi**
□ **Homme ou femme au foyer**
□ **Etudiant, lycéen**
□ **Autre, précisez : …**

Vous êtes…

□ **Une femme**
□ **Un homme**

Merci d'indiquer votre âge (si vous le souhaitez)

Annexe V 1.

Production scientifique en lien avec le sujet de thèse.

Période 2018-2023.

1) Articles à comité de lecture

Portanguen, S., Meurillon, M., Duconseille, A., Drancourt, N., Peyron, M.A., Sicard, J., Dumoulin, C., Théron, L., Tournayre, P., Astruc, T. & Mirade, P. S. Using the glycation reaction to texturize 3D printed foods for people with oral declines: a review. En cours de révision.

Portanguen, S., Dumoulin, C., Duconseille, A., Meurillon, M., Mirade, P.S. & Astruc, T. Effects of the glycation reaction on the chemical structure of gelatin gels - Application to the design of functional foods by 3D printing. En préparation.

Portanguen, S., Dumoulin, C, Duconseille, A., Meurillon, M., Sicard, J., Théron, L., Chambon, C., Sayd, T., Mirade, P.S. & Astruc, T. Impact of water content and Bloom index on gelatin glycation. *Food Hydrocolloids* (IF=10.7), *145*, 109096. DOI : 10.1016/j.foodhyd.2023.109096. **Annexe V 7**.

Schiell, C., **Portanguen, S.**, Scislowski, V., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2023). Investigation into the physicochemical and textural properties of an iron-rich 3D-printed hybrid food. *Foods* (IF=5.6), *12*, 1375-1391. https://doi.org/10.3390/foods12071375.

Portanguen, S., Tournayre, P., Gibert, P., Leonardi, S., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2022). Development of a 3D printer for the manufacture of functional food protein gels. *Foods* (IF=5.6), 11, 458. DOI : 10.3390/foods11030458. **Annexe V 5**.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P.-S. (2019). Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends in Food Science & Technology* (IF=8.5), *86*, 188-198. DOI : 10.1016/j.tifs.2019.02.023. **Annexe V 4**.

2) Chapitre d'ouvrage

Portanguen, S., Meyer, V., Meurillon, M., Guittard, M., Duconseille, A., Schiell, C., Araszkiewiez, J., Astruc, T. & Mirade, P.S. (2024). Social acceptability of new food processes and novel foods - Application to 3D printing and hybrid foods, Chapter 21 (titre provisoire). In: *Innovative Food Processing and Packaging Technologies: Present and Future,* United States Department of Agriculture, Elsevier. En préparation.

Duconseille, A. & **Portanguen, S.** (2023). La conception d'aliments fonctionnels par impression 3D, est-ce acceptable de l'accepter ? L'acceptabilité sociale – Enjeux de société et controverses scientifiques. Presses de l'école des Mines. **Annexe V 8**.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P. (2022). 3D food printing: Genesis, trends and prospects. In R. Bhat (Ed.), *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges* Elsevier Inc. ed., (pp. 18). DOI : 10.1016/b978-0-323-91001-9.00008-6. **Annexe V 6**.

3) Congrès et colloques : communications orales

Duconseille, A. & **Portanguen, S.** (2023). La conception d'aliments fonctionnels par impression 3D, est-ce acceptable de l'accepter ? Colloque international. L'acceptabilité sociale : enjeu de gouvernance, enjeu de société. Nice, 25-26 mai.

Schiell, C., **Portanguen, S.**, Scislowski, V., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2022). Investigation of the physicochemical and textural properties of an iron-rich 3D-printed hybrid food. In 68th International Congress of Meat Science and Technology. Kobe, Japan.

Portanguen, S., Tournayre, P., Brunel, T., Fortune, M. & Mirade, P.S. (2021). L'impression 3D appliquée à l'alimentaire. 16èmes Journées de la Mesure et de la Métrologie, INRAE, Ardes sur Couze, France.

Tournayre, P., **Portanguen, S.**, Gibert, P., Gameiro, T. & Mirade, P.S. (2021). Modification d'une imprimante 3D FDM pour l'impression alimentaire. 16èmes Journées de la Mesure et de la Métrologie, INRAE, Ardes sur Couze, France.

Mercier, F., Tournayre, P., **Portanguen, S.** & Mirade, P.S. (2021). Impression 3D métal : Intérêts et contraintes. 16èmes Journées de la Mesure et de la Métrologie, INRAE, Ardes sur Couze, France.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2019). Conception d'aliments à fonctionnalités ciblées par impression 3D. XVIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Nantes, France.

4) Congrès et colloques : posters

Portanguen, S., Dumoulin, C., Meurillon, M., Duconseille, A., Sicard, J., Mirade, P.S., Sayd, T., Chambon, C., Théron, L. & Astruc, T. (2023). Meat based functional food – Variability of the glycation reaction in gelatin. In 69th International Congress of Meat Science and Technology. Padova, Italy.

Schiell, C., **Portanguen, S.**, Scislowski, V., Rivard, C., Mirade, P.S. & Astruc, T. (2023). Iron distribution and oxidation in a 3D-printed animal/plant hybrid food using synchrotron X-ray radiation. In 69th International Congress of Meat Science and Technology. Padova, Italy.

Schiell, C., **Portanguen, S.**, Scislowski, V., Rivard, C., Mirade, P.S. & Astruc, T. Impact of storage conditions and time on iron distribution and state in a 3D-printed hybrid food. 26èmes Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, 5-6 juin 2023, Clermont-Ferrand.

Portanguen, S., Tournayre, P., Astruc, T., Mirade, P.S. (2022). Texturing of a functional food by 3D printing – Development of a 3D printer prototype. 25èmes Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, 18-19 mai 2022, Clermont-Ferrand.

Duconseille, A., **Portanguen, S.**, Tournayre, P., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2022). Development of new foods rich in animal proteins adapted to the masticatory capacity of seniors. In 36th EFFoST International Conference. Dublin, Ireland.

Tournayre, P., **Portanguen, S.**, Sicard, J, Mirade, P.S. (2018). Study and realization of a 3D printhead for meat-based food. *32th EffoST*, Nantes, France.

Tournayre, P., **Portanguen, S.**, Sicard, J, Mirade, P.S. (2018). Etude et réalisation d'une tête d'impression 3D pour aliments carnés. J2M INRA, Ile d'Oléron, France.

5) Documents de transferts

Déclaration d'Invention et de Résultats Valorisables DI-RV-21-0012 (2021) : Adaptation et optimisation d'une imprimante 3D FDM (*Fused Deposition Modeling*) pour la conception d'aliments fonctionnels de type produits carnés. Inventeurs : Tournayre, P., Gibert, P., **Portanguen, S.**, Mirade, P.S. **Annexe S 2.3.**

Dépôt en ligne auprès de l'INPI d'une enveloppe Soleau électronique DSO2021006565 (2021). Sur la base de la DI-RV-21-0012 (2021), inventeurs : Tournayre, P., Gibert, P., **Portanguen, S.**, Mirade, P.S. **Annexe S 2.3**.

Certificat d'utilité n° 21 08274 (2021) : Support de flacon et ensemble comprenant au moins un tel support de flacon. Déposant : INRAE. Inventeurs : **Portanguen, S.**, Tournayre, P., Gibert, P., Mirade, P.S. **Annexe S 2.3**.

Déclaration d'Invention et de Résultats Valorisables DI-RV-20-0104 (2020) : Conception d'une nouvelle gamme de valets/supports pour ballons et autres récipients à fonds ronds, mono- ou multi-cols, pour l'usage en laboratoire ou en industrie. Inventeurs : **Portanguen, S.**, Tournayre, P., Gibert, P., Mirade, P.S. **Annexe S 2.3**.

6) Offre technologique

Offre technologique INRAE/INRAE Transfert « Bioprocédés-Biotechnologies blanches-Environnement » destinée à être diffusée aux professionnels (entreprises…). Gamme de valets/supports pour ballons et autres récipients obtenus notamment par impression 3D (2023). **Annexe S 2.3**.

7) Vulgarisation et transferts des résultats de recherche

Portanguen, S., Tournayre, P., Astruc, T., Mirade, P.S. (2023). Une imprimante 3D pour concevoir des aliments fonctionnels à base de protéines carnées. « Fait marquant », Rapport recherche et innovation, département INRAE/Transform.

Portanguen, S. Présentation de l'impression 3D alimentaire à la correspondante locale de l'Agence France Presse (AFP) (30/06/2023).

Portanguen, S. Interview avec Mathilde Debry, journaliste pigiste pour Pourquoidocteur.fr, Mieuxvivresante.fr… (24/03/2023) :

https://www.mieuxvivresante.fr/Nutrition/Alimentation_Recettes/2747-Impression-3D-des-aliments-la-revolution-nutritionnelle-en-marche

Chaunier, L. & **Portanguen, S.** (2020). La fabrication additive de pièces comestibles fonctionnelles. A3DM. Magazine n° 27, p42-49.

Portanguen, S. (2019). La conception d'aliments à fonctionnalités ciblées par impression 3D. *La Traverse Auvergne-Rhône-Alpes,* n°9 – trimestre 2, p6.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P. S. (2018). Vers la conception d'aliments à fonctionnalités ciblées et de bioproduits par impression 3D. *Science et technologie des aliments, 1* (Numéro 1).

Annexe V 2.

Apprentissage du métier de chercheur.

Le métier de chercheur n'est pas circonscrit uniquement à la science en tant que telle mais également à un certain nombre d'activités annexes, destinées à financer ou à valoriser la recherche. Cette annexe a pour objectif de présenter les différentes missions que j'ai pu exercer, en parallèle de mon travail de doctorat, afin de me préparer et de me former au métier de chercheur.

1) Les réponses aux appels à projets

J'ai participé à plusieurs réponses à appels à projet, dont certains en tant que porteur. La plupart de ces projets ont permis, par leur financement, d'initier ou de conforter la thématique « impression 3D alimentaire » au sein de l'unité QuaPA, soit par des investissements matériels, soit par le recrutement de personnels non-titulaires.

Nom	Année	Type	Partenaires	Financement (k€)	Porteur
Foods and drugs printing in space (en cours)	2023	Agence Spatiale Européenne	Consortium international	?	Duconseille, A.
SAMASTIC - Coupler sciences des aliments, mastication et sciences et technologies de l'information et de la communication pour concevoir des aliments fonctionnels imprimés en 3D socialement acceptables et destinés à des populations présentant des déficiences masticatoires.	2023-2024	Action Nouvelle Soutenue (ANS) INRAE département Transform	CROC UNH Université Côte d'Azur	30	Portanguen, S.
Kinetic of iron localization and characterization of its oxidation states in a 3D printed hybrid functional food	2022	Proposal Synchrotron SOLEIL	ADIV	Expérimentations financées	Portanguen, S.

Glyc'3D - Investigation de la réaction de glycation sur la texturation de produits alimentaires fabriqués par impression 3D.	2019-2020	Emergence (CAP 20-25) Université Clermont-Auvergne	CROC UNH	29	Mirade, P.S (animateur Portanguen, S.)
3D Bio		CPER – Défi Epicure (2020-25)	Sigma Clermont-Ferrand LMGE (UCA)	464	Mirade, P.S

2) Evaluation de manuscrits scientifiques

L'impression 3D est considérée comme une technologie émergente, notamment dans le domaine alimentaire. Même si le nombre d'articles scientifiques publiés croît de façon importante depuis quelques années, le nombre d'équipes de recherche ou de scientifiques/ingénieurs clairement identifiés sur le sujet restent encore relativement restreints. C'est pourquoi j'ai été particulièrement sollicité, depuis 2020, pour expertiser des articles dans différentes revues internationales ainsi que pour être éditeur invité pour des numéros spéciaux.

Articles expertisés :

Journal (IF)	Année	Titre
Food Chemistry (9.231)	2020	Effect of glycation degree on the in vitro simulated gastrointestinal digestion: A promising formulation for egg white gel with controlled digestibility.
Foods (5.561)	2020	Formulation of heat-induced whey protein gels for extrusion-based 3D printing.
Foods (5.561)	2021	Plant-based alternatives to yogurt: state-of-the-art and perspectives of new biotechnological challenges.
Future Foods (-)	2021	3D printing of meat post supercritical fluid extraction.
Future Foods (-)	2021	A survey of willingness to consume insects and a measure of college student perceptions of insect consumption using Q methodology
LWT–Food Science and Tech (6.056)	2021	Effect of superfine grinding on physicochemical property and 3D printing performance of white common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein extracts.
Foods (5.561)	2021	3D printing of steak-like foods based on textured soybean protein.
Future Foods (-)	2022	4D food printing and 3D programmable food texture as candidates to deliver unprecedented innovations in food manufacturing.

Foods (5.561)	2022	Physico-Chemical and Textural properties of 3D Printed Soft Hybrid Meat Analogues.
LWT–Food Science and Tech (6.056)	2022	Improvement of rheological properties and 3D printability of pork pastes by the addition of xanthan gum.
Innovative Food Science and Emerging Tech (7.104)	2022	Effects of hydrocolloids on the mechanical and structure performance of 3D printed chicken meat.
Food Chemistry (8.8)	2023	Characteristics of meat flavorings prepared using hydrolyzed plant protein mix by sous vide, conventional, and two-stage heating processes.
Current Opinion in Food Science (9.9)	2023	Plant protein edible inks for 3D and 4D food printing applications

3) Edition scientifique

J'ai été sollicité, depuis 2020, pour assurer le rôle d'éditeur invité de plusieurs numéros spéciaux de la revue internationale *Foods* (MDPI) (IF=5.561). J'ai accepté de coordonner (en binôme), 2 n° spéciaux. Sujets proposés et acceptés :

- Emerging Technologies in the Food Industry: Sustainability Assessment and Consumer Acceptability, en collaboration avec P.S Mirade. 13 articles publiés.
- Special Issue on New Sources of Animal Products to Feed Sustainably in Hostile Environments, en collaboration avec A. Duconseille. 2 articles publiés.

4) La structuration des outils de la recherche

Le financement obtenu dans le cadre du CPER (Contrat de Plan Etat Région), en 2020, a permis d'investir dans la création d'un laboratoire de conception numérique d'aliments. Ce laboratoire, dont j'ai la responsabilité, est équipé de différentes solutions 3D : conception assistée par ordinateur, imprimantes polymères, métaux et alimentaires, scanner 3D et dispositifs de post-traitement. Ces équipements sont destinés à concevoir et fabriquer des dispositifs et des prototypes liés à la thématique « impression 3D alimentaire » de l'équipe Imagerie & Transferts, mais également pour les autres projets de l'équipe et de l'unité. Ces nouveaux outils ont également permis de développer des collaborations entre unités INRAE, avec notamment l'UMR 1019 Nutrition Humaine (une Déclaration d'Invention de de Résultats Valorisables a été déposée) et Herbipôle (UE 1414).

5) L'encadrement et la formation d'étudiant(e)s

Le travail réalisé lors de cette thèse de doctorat était pluridisciplinaire. Des compétences complémentaires ont été mobilisées dans des domaines relevant des procédés, de l'électronique, de la biochimie… J'ai pu encadrer ou co-encadrer plusieurs étudiant(e)s de différents niveaux.

Etudiant(e)s	Année	Formation	Sujet
Encadrement (maître de stage)			
N. Lebert	2019	1ère année ingé. Arts et Métiers	Conception et numérisation de pièces par impression 3D
T. Brunel	2020	2ème année ingé. UTC	Investigation de la réaction de glycation sur la texturation de produits alimentaires fabriqués par impression 3D
M. Fortune	2021	M1 Univ. Clermont-Auvergne	Mise en place d'une méthode d'hydrolyse enzymatique pour l'étude de la réaction de glycation dans des gels protéiques
C. Dumoulin	2022	M2/ingé. ONIRIS	Etude de la variabilité de la réaction de glycation dans des gels de gélatine par une approche multi-échelle
Co-encadrement (Avec le Dr Pascal Tournayre)			
T. Gameiro	2019	DUT IUT d'Allier	Adaptation d'une imprimante 3D pour l'alimentaire.
P. Gibert	2020-21	2ème année ingé. UTC	Caractérisation et optimisation d'une imprimante 3D alimentaire
S. Léonardi	2021-22	3ème année ingé. UTC	Développement d'une solution couplée d'extrusion et de post-traitement pour l'impression 3D alimentaire

J'ai participé (et participe) aux comités de thèse de trois doctorantes, deux en tant que « parrain » de l'école doctorale SVSAE (Noémie Drancourt et Sophie Piaton, dentistes effectuant une thèse de sciences) et, un en tant que membre invité (Coline Schiell, thèse CIFRE ADIV/INRAE).

6) Le développement d'un réseau de collaborations

La mise en place et le développement de la thématique de conception d'aliments par impression 3D a été l'occasion de nouer des collaborations à plusieurs niveaux, au niveau national et international :

- Au sein de l'unité QuaPA avec le projet Emergence qui faisait intervenir environ 10 personnes de différentes équipes ;
- Au sein d'INRAE avec l'UMR Nutrition Humaine ;
- Avec l'Université Clermont-Auvergne : des liens étroits ont été créés avec le Centre de Recherches en Odontologie Clinique (désormais unité sous contrat INRAE/Transform) ;
- Des discussions ont débuté avec l'UMR 0454 Medis/Université Clermont-Auvergne et l'Institut Pascal ;
- Avec l'Université Côte d'Azur. J'ai été sollicité par l'unité TransitionS/IMREDD afin de construire une collaboration entre les sciences du vivant et les sciences humaines et sociales. Une collaboration étroite et pérenne est désormais engagée entre les unités TransitionS/IMREDD et QuaPA (2 colloques organisés, 1 participation conjointe à un colloque international, 1 Action Nouvelle Soutenue financée par le département INRAE Transform) ;
- Dans l'optique de déposer un dossier auprès de l'Agence Spatiale Européenne, j'ai été contacté par Dirk Neefs (dentiste Belge) afin de monter un consortium pour trouver des solutions de nutrition dans l'espace (futures bases lunaires). J'ai activement participé à mettre en place ce consortium et, un projet est en cours de rédaction sous la coordination du Dr Anne Duconseille.

Annexe V 3.

Liste des documents de transferts réalisés au cours de ce travail de thèse.

Lors de ce travail de thèse, l'imprimante 3D présentée au **Chapitre 2** ainsi que des dispositifs spécifiques, pour faciliter la mise en œuvre des modes opératoires lors des phases expérimentales, ont été développés. Certains de ces développements ont fait l'objet de « Déclaration d'Invention ou de Résultats Valorisables » :

- L'imprimante 3D : DI-RV-21-0012 (2021) et enveloppe Soleau électronique DSO2021006565 (2021) ;
- Valets supports pour la manipulation de ballons en verre à fonds ronds : DI-RV-20-0104 (2020) et Certificat d'utilité n° 21 08274 (2021) ;

Adaptation et optimisation d'une imprimante 3D FDM (Fused Deposition Modeling) pour la conception d'aliments fonctionnels de type produits carnés

DECLARATION D'INVENTION ET DE RESULTATS VALORISABLES - DI-RV-21-0012 (2021) (version résumée)

Co-inventeurs et contributions : Tournayre Pascal (25 %), Gibert Paul (25 %), Portanguen Stéphane (25 %), Mirade Pierre-Sylvain (25 %).

Adaptation et optimisation d'une imprimante 3D FDM (Fused Deposition Modeling) pour la conception d'aliments fonctionnels de type produits carnés. A l'heure actuelle, l'impression 3D de matrices carnées ne peut être réalisée, sans avoir recours à des additifs chimiques. Cet outil est, avant tout, destiné à tester différentes formulations d'aliments, avec une maîtrise optimale des paramètres du procédé par des moyens de régulation thermique, aussi bien de chauffage au niveau de la tête d'impression, que de refroidissement au niveau du plateau d'impression de l'imprimante. Cette dernière fonctionnalité étant, à notre connaissance, absente des imprimantes 3D alimentaires disponibles sur le marché.

Notre démarche a tout d'abord consisté à développer de nouveaux dispositifs au sein d'une imprimante du commerce (tête d'impression et plateau), puis à les intégrer de façon ergonomique afin qu'un utilisateur non spécialiste puisse s'en servir.

Pour cela, il a fallu repenser complétement l'automatisation/contrôle des différents dispositifs existants, mais aussi ceux ajoutés à l'imprimante commerciale.

La carte électronique de contrôle initiale ne possédant pas les entrées/sorties nécessaires au pilotage des nouvelles fonctionnalités, il a été décidé, plutôt que de repenser l'ensemble de l'automatisme, de la conserver pour gérer les déplacements et les mesures de températures et de lui adjoindre une carte microcontrôleur de type « Arduino Mega » pour piloter les éléments ajoutés.

L'avantage de cette solution est qu'elle permet d'intégrer l'ensemble des nombreux ajouts en concentrant les efforts de développement sur le nouveau logiciel de la carte additionnelle, tout en ne modifiant que très peu celui existant (firmware) dans la carte électronique initiale. Malgré tout, ceci a demandé des efforts de développement supplémentaires, car il s'est avéré indispensable de mettre en place un dialogue entre les deux cartes pour échanger les informations nécessaires à l'automatisation du procédé d'impression (Ex. : régulation de températures par la carte additionnelle ou position de la tête d'impression).

Pour peaufiner l'ergonomie d'utilisation, un nouvel écran tactile a été substitué à celui d'origine, ce dernier ne permettant pas de créer les nouvelles fonctions d'affichage et de commande. L'ensemble du pilotage de l'imprimante a ainsi été repensé et adapté à nos besoins.

Aujourd'hui, il est facile de lancer une impression complète, très simplement, depuis cet écran de contrôle.

Il existe actuellement de nombreux modèles d'imprimantes 3D alimentaires sur le marché, ainsi que d'autres modèles développés en laboratoire de recherche qui ont fait l'objet de publications ou de brevets. Le tableau ci-dessous dresse une liste, qui se veut la plus exhaustive possible, des imprimantes 3D alimentaires actuellement commercialisées. Comme il est indiqué dans ce tableau, peu de modèles sont capables d'imprimer des produits carnés, et lorsque que cela est le cas, la texturation du produit est souvent mal maîtrisée.

Imprimantes	**Plateau refroidissant**	**Tête refroidissante/chauffante**	**Impression produits carnés**	**Modulable pour R&D**
byFlow Focus	Non	Non/ ?	Oui	Non
Ou Edge Choc Creator V2.0 Plus	Non	Non/oui	Non	
Micromake Food 3D printer	Non	Non/oui	Non	Non
Mmuse – Chocolate 3D printer	Non	Non/oui	Non	Non
Natural Machines Foodini	Non	Non/oui	Oui, mais très limité	Non
PancakeBot 2.0	Non	Non/non	Non	Non
ZMorph VX	Non	Non/non	Non	Non
CocoJet	Non	Non/oui	Non	Non
Bocusini	Non	Non/oui	Purées ou mousses	Non
ChefJet	Non	Non/oui	Non	Non
Print2Taste Mycusini	Non	Non/oui	Non	Non
Structur3D Discov3ry	Non	Non/oui	Non	Non
Print2Taste Procusini	Non	Non/oui	Non	Non
Wiiboox Sweetin	Non	Non/oui	Oui (jambon)	Non
Createbot 3D Food Printer	Non	Non/oui	Non	Oui
Bégin-Drolet (2017)	Non	Oui/oui	Non	Oui
Zeleny (2017)	Non	Non/oui	Non	Oui
Noort (2017)	Non	Non/?	Non	Non
Présente invention	**Oui**	**Oui/oui**	**Oui**	**Oui**

Les co-inventeurs ont également passé en revue les résumés (seuls documents disponibles) de 60 brevets liés à la conception d'imprimantes 3D alimentaire, parmi les 374 ayant trait aux mots clés : « *3D food printing* » (https://worldwide.espacenet.com/). Parmi ces 60 brevets, trois semblent traiter de systèmes de refroidissement (Zhu et al., 2016 ; Wang et al., 2017 ; Zhang et al., 2020) qui pourraient offrir des solutions équivalentes à la présente invention. Il est, néanmoins, difficile, au vu des informations contenues dans ces résumés, d'en être totalement sûr. A noter que les travaux de Zhang et al. (2020) semblent porter uniquement sur l'impression 3D de chocolat et non, de produits carnés.

Conception d'une nouvelle gamme de valets/supports pour ballons et autres récipients à fonds ronds, mono- ou multi-cols, pour l'usage en laboratoire ou en industrie.

DECLARATION D'INVENTION ET DE RESULTATS VALORISABLES - DI-RV-20-0104 (2020) ET CERTIFICAT D'UTILITE (actif jusqu'en juillet 2024)

Co-inventeurs : Tournayre Pascal (25 %), Gibert Paul (25 %), Portanguen Stéphane (25 %), Mirade Pierre-Sylvain (25 %).

Conception d'une nouvelle gamme de valets/supports pour ballons et autres récipients à fonds ronds, mono- ou multi-cols, pour l'usage en laboratoire ou en industrie.

Les supports décrits dans le présent document ont pour objet de combler un manque dans les matériels de laboratoire proposés par les fournisseurs du domaine. Ces supports sont conçus par CAO (Conception Assistée par Ordinateur) et, les prototypes sont fabriqués par impression 3D (fabrication additive). Ils ont pour originalité : 1) de pouvoir accueillir des récipients à fonds ronds de volumes différents (valet modulable, plusieurs volumes possibles par valet), 2) d'éviter le renversement des récipients qui peuvent être agités inclinés et, 3) de permettre une agitation de 3 récipients, de façon simultanée, sur un même agitateur magnétique de façon ergonomique et à moindre coût.

L'idée de cette invention est survenue lors de la manipulation de récipients à fonds ronds de type ballons. Ces récipients sont très utilisés, principalement dans le domaine de la chimie organique, car leur forme permet une meilleure agitation du contenu, ainsi qu'un chauffage homogène lorsqu'ils sont placés dans un chauffe-ballon. Les valets/supports sont indispensables pour la manutention de ces récipients : maintien lors du remplissage, stockage au cours de l'expérimentation, prélèvement d'échantillons… Mais, les modèles disponibles dans le commerce sont limités dans leur utilisation et ne permettent pas une manipulation sécurisée de la verrerie de laboratoire (pas de dispositif anti-basculement, donc risque de renverser et de perdre des échantillons potentiellement précieux et/ou dangereux pour la santé et l'environnement). De plus, les contraintes expérimentales nécessitent souvent d'utiliser plusieurs récipients en parallèle, notamment pour l'agitation magnétique (à chaud ou à température ambiante). Et, à moins d'investissements conséquents en dispositifs spécifiques (blocs réactionnels interchangeables métalliques), la plupart des utilisateurs utilisent des potences, noix et pinces pour maintenir plusieurs de ces récipients sur un même agitateur magnétique. Cette solution n'est pas satisfaisante car, chronophage, peu ergonomique, peu sécurisante, encombrante et onéreuse. Nous avons donc conçu, en parallèle des valets/supports, un dispositif permettant de maintenir trois récipients sur un agitateur magnétique de manière ergonomique, et ce, rapidement et sans avoir recours à aucun autre matériel supplémentaire.

Les travaux de conception/développement des valets/supports ont débuté en septembre 2020 et se sont terminés en Novembre 2020. Ces travaux ont eu lieu, exclusivement, dans les locaux occupés par l'équipe Imagerie & Transferts (Bâtiment Techno 2000, UR370 Qualité des Produits Animaux, Centre INRAE Clermont Auvergne-Rhône-Alpes, 63122 Saint-Genès-Champanelle).

Il s'agit d'un nouvel ensemble de produits, venant en complément des dispositifs existants sur le marché et, qui comble un certain nombre de leurs lacunes. Aucun document n'a été rédigé concernant cette invention. Mais, des plans développés par CAO existent, ainsi qu'un certain nombre de prototypes fabriqués par impression 3D en acide polylactique, un bioplastique. A noter que d'autres matériaux peuvent être mis en œuvre, en fonction des conditions d'utilisation ou des besoins des futurs utilisateurs (différents plastiques techniques, métaux de type acier inoxydable, cuivre…). Ce large choix de matériaux est notamment intéressant aux vues des contraintes thermiques liées aux expérimentations car, des matériaux conducteurs ou, au contraire, isolants peuvent être utilisés pour la fabrication des valets. Les applications sont clairement destinées aux laboratoires ou aux industries utilisant des ballons, ou autres récipients, à fonds ronds. Le domaine cible privilégié est la chimie mais, des applications sont également possibles en sciences du vivant.

L'invention décrite ici se démarque des dispositifs existants par :

- Une modularité permettant de limiter le nombre de valets/supports à acheter pour les utilisateurs ;
- L'existence d'une fonction anti-basculement des récipients, assurée à la fois par la géométrie du dispositif, mais également par la présence d'une pièce en matériau souple anti-glissement ;
- L'invention comprend un bloc réactionnel permettant d'accueillir les valets/supports modulables et, de différentes tailles, afin de les disposer sur un agitateur magnétique ;
- En fonction des exigences d'un futur fabricant/distributeur, les inventeurs seront capables de développer des prototypes, de façon rapide grâce à la technologie d'impression 3D (en plastique ou en métal).

Principaux avantages :

- La conception des dispositifs par CAO/impression 3D permet d'optimiser la quantité de matière à utiliser pour la fabrication pour un moindre impact environnemental ;
- La sécurisation des échantillons et des utilisateurs (dispositif anti-basculement) ;
- Une technologie directement utilisable par les utilisateurs. Un simple schéma permet de comprendre la manière de s'en servir ;

- Une production à grande échelle permettrait d'obtenir les dispositifs à des coûts très compétitifs. En fonction d'une étude de marché, une fabrication massive pourra être envisagée par des méthodes conventionnelles (injection plastique/moulage ou usinage). Mais, aussi par des techniques d'impression 3D métal conçues pour la production de série. Les inventeurs sont d'ailleurs en contact avec une société utilisant cette technologie pour, à la fois, leur retour d'expérience, mais aussi pour une estimation des coûts de production. A noter que dans le cas d'une production conventionnelle par injection/moulage, l'impression 3D permet également d'abaisser les coûts de conception des moules.

Principal inconvénient :

L'encombrement du dispositif est le même, quel que soit le volume du récipient utilisé.

Etat de la concurrence :

A notre connaissance, aucune équipe ne travaille sur le développement de ce type de dispositifs. Il faut savoir que les ballons à fonds ronds sont utilisés depuis des décennies, en chimie notamment, et que, depuis, aucun dispositif innovant n'est apparu sur le marché pour les maintenir de façon stable et ergonomique. Les seuls dispositifs existants (toujours à notre connaissance) sont de simples anneaux en liège ou en silicone, qui ne permettent de maintenir que deux tailles différentes de récipients. Notre dispositif pourra en maintenir au moins trois. Ceci représente déjà une économie substantielle pour les utilisateurs, ainsi qu'un gain de place dans les laboratoires (les dispositifs sont également conçus pour être facilement empilables). D'autres modèles, multi-volumes existent dans le commerce, mais ne permettent pas d'éviter que le ballon ne se renverse. Enfin, des éléments métalliques, mono-volume sont également disponibles sur le marché. Leur coût est très élevé, jusqu'à plusieurs centaines d'euros, et ils ne sont pas modulables. Ils permettent néanmoins l'agitation d'un ou plusieurs récipient(s) sur un agitateur magnétique, ce que notre invention permet également.

Bioprocédés - Biotechnologies blanches - Environnement

Gamme de valets/supports pour ballons et autres récipients à fond rond

INRAE › transfert

INRAE
la science pour la vie, l'humain, la terre

Description

Les récipients de type ballon à fond rond sont couramment employés pour une bonne agitation, un chauffage homogène et doivent être correctement maintenus. L'équipe Imagerie & Transferts de l'Unité de Recherche INRAE Qualité des Produits Animaux a mis au point une gamme de valets/supports qui maintient trois formats différents de récipients sur un agitateur magnétique de manière ergonomique sans l'utilisation de potences, noix ou pinces. Ce dispositif permet une sécurisation des échantillons et des utilisateurs.

Type de transfert envisagé

Option/Licence d'exploitation sur le modèle et le savoir-faire, dont possibilité de collaboration.

Avantages

- Meilleur positionnement des ballons ;
- Pas de risque de basculement/renversement : sécurité renforcée ;
- Agitation optimisée pour un plus grand nombre de ballons par agitateur (x7) ;
- Praticité et modularité (rangement-réutilisation) ;
- Fabrication du système : moins d'utilisation de matière en utilisant l'impression 3D, et à moindre coût ;
- Un support pour 3 volumes de ballons différents.

Applications potentielles

Pour la chimie de synthèse, la chimie organique, la biologie et plus largement pour toutes activités de laboratoire pour l'industrie, la recherche ou l'éducation.
Des adaptations sont possibles tant en termes de tailles que de matières utilisées grâce à la Conception Assistée par Ordinateur (CAO) et à l'impression 3D plastique/composite ou métal.

Mots clés

valet, support, ballon à fond rond, impression 3D, chimie

Echelle TRL

1 2 3 4 5 **6** 7 8 9

Stade de développement

Les prototypes développés par l'unité QuaPA peuvent convenir jusqu'à une échelle semi-industrielle. L'équipe souhaiterait collaborer pour développer le dispositif en différents matériaux : plastiques/composites ou métaux.

Laboratoire:
INRAE UR0370 QuaPA Qualité des Produits Animaux

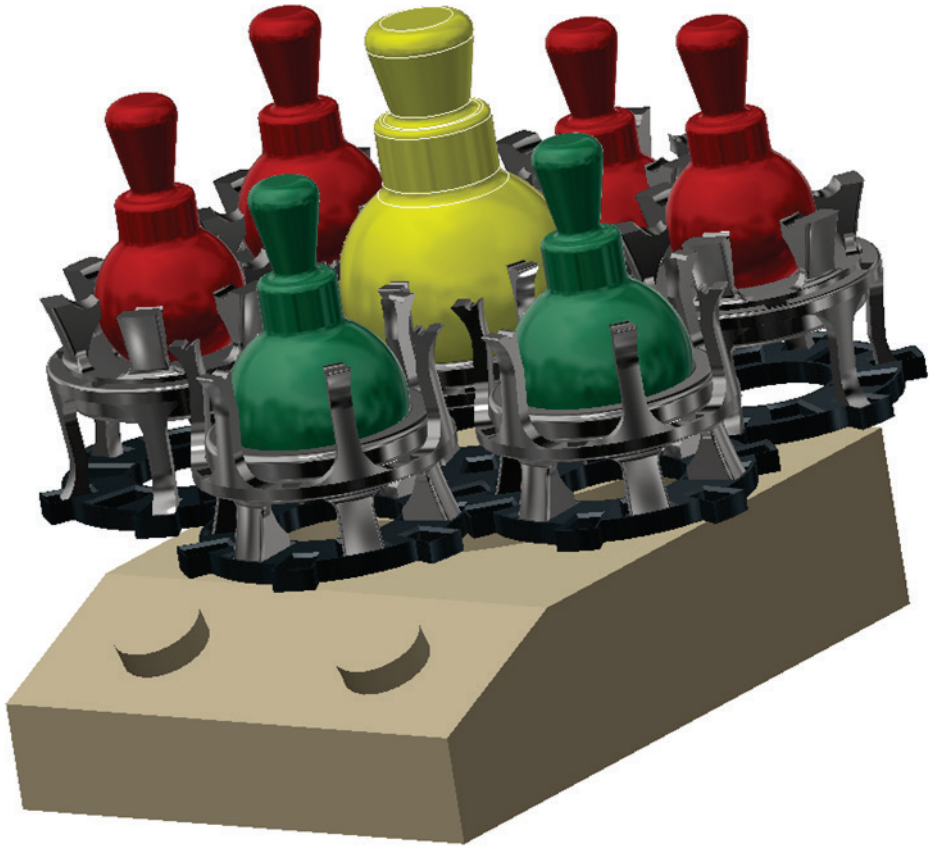
Chercheurs:
Stéphane Portanguen, Pascal Tournayre, Paul Gibert, Pierre-Sylvain Mirade

Contact:
Laure Akomia Chargée de Valorisation Bioéconomies & bioprocédés
laure.akomia@inrae.fr 07 85 53 04 74

Date: 31-05-2021

Siège social : 28, rue du Dr. Finlay - 75015 Paris - Tél. : 01 42 75 95 00 - Télécopie : 01 45 77 63 90
Société par Actions Simplifiée au capital de 1 920 000 € - RCS PARIS B 433 960 762 - SIRET : 433 960 762 00030 - APE 6630Z - TVA FR 96 433 960 762
Portefeuille d'offres de technologie d'INRAE Transfert : www.inra-transfert.fr/

Offre technologique pour diffusion auprès des réseaux professionnels (scientifiques et industriels).



Vue générale des dispositifs positionnés sur un agitateur magnétique (ballon de 25 mL en rouge, de 50 mL en vert et de 100 mL en jaune).

Annexe V 4.

Article « Portanguen et al. (2019) Trends in Food Science & Technology ».

TrendsinFoodScience&Technology86(2019)188–198

Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Food Science & Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tifs

Review

Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review

Stéphane Portanguen, Pascal Tournayre, Jason Sicard, Thierry Astruc, Pierre-Sylvain Mirade*

INRA, UR 370 Qualité des Produits Animaux (France), 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Additive manufacturing
By-products
Protein
Personalization
Sustainable development
Consumer acceptability

ABSTRACT

Background: 3D printing or additive manufacturing (AM) now provides enormous freedom to design, manufacture and innovate in various domains, even in foodstuffs development. Given the immense potential applications related to AM, many authors are even talking about a new industrial revolution.

Scope and approach: In this article, we review the state of the science in applied AM methods for developing biobased products in the medical and food sectors, with these two sectors having similar points. We were therefore interested in the technological locks encountered in the various studies carried out on the subject. Consideration has also been given to the possibility of using alternative sources of protein, such as animal by-products, to address resource management and sustainable development issues. One of the strengths of 3D printing is personalization, so we chose to evaluate the impact of this technology on target populations and evaluate the possible evolutions.

Key findings and conclusions: In order to design food in optimal conditions, the development of new 3D printers is fundamental 1) to ensure the sanitary quality (both microbiological and chemical) of these products, and 2) to control the structure and texture of these 3D-printed foods. From there, it will be possible to propose personalized foods, adapted to different categories of population (e.g. seniors or young people ...). The major challenge in the next years will be to develop, using 3D printing, meat products or products blending alternative protein sources that remain perfectly structured without having to use additives. The final step will be to garner consumer acceptance for these 3D-printed foods.

1. Introduction

Additive manufacturing (AM), popularly dubbed "3D printing", has emerged, expanded and matured to a stage where it provides enormous freedom to design, manufacture and innovate in spheres from mechanical engineering (Chen et al., 2017) and aeronautics (Ford, Mortara, & Minshall, 2016) to design science (Areir, Xu, Harrison, & Fyson, 2017; Lanaro et al., 2017; Takezawa & Kobashi, 2017), biomedical engineering (Singh & Ramakrishna, 2017), the pharmaceutical industry (Goole & Amighi, 2016; Icten et al., 2017), biotechnology (Krujatz et al., 2017), and even food (Pinna et al., 2017). The literature on 3D printing technologies is booming, and with the immense promise and potential applications unlocked by AM, a number of authors are even starting to talk about a new industrial revolution (Attaran, 2017; Campbell, Williams, Ivanova, & Garett, 2011; Gross, Erkal, Lockwood, Chen, & Spence, 2014). There are niche markets (jewellery, luxury cars, and others) where AM is already used to produce certain objects which are then marketed (Ford et al., 2016). Research in 3D printing is expanding, as the technology is ideally geared to the rapid prototyping phases (Attaran, 2017; Berman, 2012) that require feasibility without mass production and rapid manufacturing. AM is a digitally-controlled robotic construction process, which can build up complex solid forms layer by layer and apply phase transitions or chemical reactions to bind the layers together (Sun, Peng, Yan, Fuh & Hong, 2015a). To do this, several reference techniques exist, using different materials. We can cite: binder jetting (Meteyer, Xu, Perry, & Zhao, 2014), directed energy deposition (Heigel, Michaleris, & Reutzel, 2015), material jetting (Krujatz et al., 2017), powder bed fusion/binding (Huang, Liu, Mokasdar, & Hou, 2012), sheet lamination (Shimizu et al., 2014), vat photopolymerization (Singh, Ramakrishna, & Singh, 2017) and material extrusion (Huang et al., 2012). Versatility is another big reason to use AM, particularly for biobased products. Indeed, being able to work from the macroscopic scale (e.g. 3D-printing of foodstuffs) up to a microscopic scale (e.g. cell-by-cell deposition for the construction of organs or tissues) makes it possible thanks to the wide range of existing printing techniques. For 3D printing of biobased products or foods, the

* Corresponding author.
E-mail address: pierre-sylvain.mirade@inra.fr (P.-S. Mirade).

https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.023
Received 4 May 2018; Received in revised form 6 August 2018; Accepted 6 February 2019
Availableonline14February2019
0924-2244/©2019ElsevierLtd.Allrightsreserved.

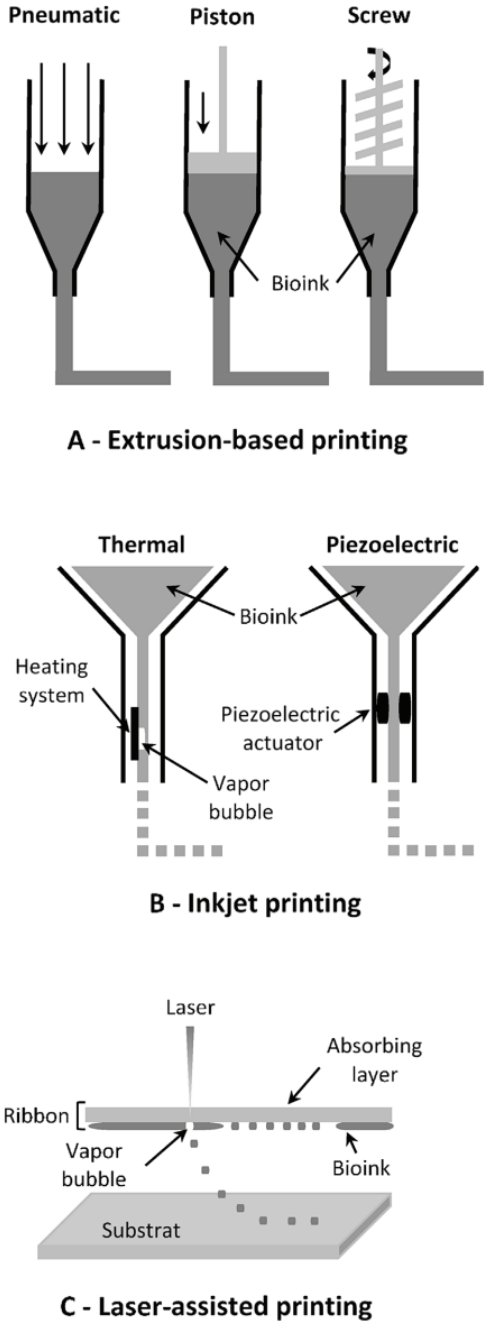


Fig. 1. Schematic representation of the operating principles of the main 3D printing methods used in the food sector: A) extrusion-based printing in the form of pneumatic, piston-driven or screw-driven robotic dispensing systems, in which a continuous stream of hydrogel is dispensed; B) thermal inkjet printers which are configured with a heater creating air-pressure pulses to generate droplets at the printhead. In piezoelectric inkjet printing, an actuator produces a mechanical pulse to force the bio-ink to flow from the nozzle as droplets. C) laser-assisted printing system which consists of a laser-absorbing layer - called the ribbon - a feeding layer of cell-laden hydrogel beneath, and a receiving substrate.

following techniques are well-suited: 1) extrusion-based printing, the most popular method in food printing (Sun, Zhou, Yan, Huang, & Lin, 2017), 2) inkjet printing (Singh, Haverinen, Dhagat, & Jabbour, 2010), and 3) laser-assisted printing (Guillotin et al., 2010). Fig. 1 schematizes the operating principles of these methods.

Practically all commercial 3D printing machines outside heavy industry, chiefly extrusion machines, are customizable, and there are even some project device designs that are open-source, enabling custom-tailored manufacturing, which is an important feature for research and R&D labs as it enables them to adapt the devices to their applications. For example, Zeleny and Ruzicka (2017) managed to adapt a commercial printer model for printing foodstuffs which originally used for fused deposition modelling of thermoplastic. While metal feed 3D printers for industry can cost up to $500,000 (Severini, Derossi & Azzolini, 2016), there are mainstream 3D printers now available that offer perfectly acceptable performances for an affordable few hundred dollars (Prusa i3®, RepRap, France; Hephestos 2®, BQ®, Spain …). This means that cost of the hardware is no longer a barrier, and so a huge number of applications can now be developed, by anyone ready to make a few appropriate machine customizations: e.g. adding of syringe pump system, embedded cooking system, or cooling system … In our opinion, personalization means a major modification and not simply to use various nozzles or needles. For instance, Bégin-Drolet et al. (2017) have developed a new printhead for making structures out of sugar, based on a system using a lead gear and a worm gear combined with an ultra-fine pitch screw to deliver a syrup contained in a syringe. To obtain a quickly solidification of the sugar, an air cooling system was added near the nozzle.

Attaran (2017) reported that worldwide revenues from AM are growing exponentially, from $3.07 billion in 2013, nearly doubling to $5 billion in 2016, and on a curve to exceed $21 billion in 2020. However, this expansion may get slowed by some key technology-related drawbacks, chiefly the size, time-to-manufacture, and cost of printed objects, and change in the regulatory landscape. That said, the many advantages over conventional 'hard' manufacturing—customizability, rapid prototyping, on-demand manufacture of spare parts, decentralized/distributed manufacturing, and more—can be expected to drive further expansion of AM in a whole number of sectors, and especially the automotive industry. Healthcare may be the sector where 3D printing holds the greatest transformative potential: the AM-driven healthcare economy, estimated at just $11 million in 2012, is projected to hit $1.9 billion by 2025 (Attaran, 2017). 3D-printed implants and tissue organs are currently the focus of intensive research (Almela et al., 2018; So, Mandas, & Hlad, 2018). To our knowledge, regarding the food sector, no economic data exist, but several industrial projects are in progress, especially in Europe (e.g. with Barilla group).

Here, in response to this content, we set out to review the state of the science in applied AM methods for developing biobased products in the medical sector, and in the food sector. Indeed, there are many common points between these two sectors, especially in terms of printing methods of proteins-based hydrogels. The review analyses the applications developed on the back of these methods, targeting the impact these methods have on the design and production-line sustainability of the biobased products *per se* and on consumer acceptability of these 3D-printed products. We also look at 3D-printed functional foods targeting different sectors of the population, and the development prospects for 3D-printed biobased products in the coming decade.

2. Biobased product development by additive manufacturing

2.1. In the medical sector

Bose, Ke, Sahasrabudhe, and Bandyopadhyay (2018) dichotomizes the two categories of 3D printing processes for biomaterials: acellular (ceramics, hydrogels, thermoplastics …) and cellular. Cellular-category biomaterials can serve as scaffolds to print living cells that will multiply

and form tissue constructs. For Krujatz et al. (2017), biofabrication and bioprinting are two tightly-linked bioengineering fields that are both synonymous with processes for living-cell and biomaterials. Most commonly used methods are inkjet printing, extrusion-based printing and laser-assisted printing (Fig. 1). The main biomedical applications are for 3D printing body tissue (Chia & Wu, 2015), from bone and organs to blood vessels, nerves, and more. Almela et al. (2017) demonstrated that 3D printing could be used to fabricate a human bone-like calcium-scaffold microstructure, and their study opens promising perspectives for bone grafting. However, despite the opportunities these techniques bring to medicine for building or regenerating organ tissue *in situ*, there are a number of technical issues still to overcome, as highlighted by Gudapati, Dey, and Ozbolat (2016), such as the droplet-based bioprinting technique that leads to narrow range of available bioink material, cell damages induced by bioprinting, restrictions on the size of constructs due to lack of vascularization and porosity … Over and above complex ethical or regulatory issues, there are also fundamental technical bottlenecks to contend with, like the narrow range of available biomaterials, the cellular lesions induced by the bioprinting process, or the mechanical and structural integrity of the tissue constructs that will affect the vascularization—and therefore the viability—of 3D-bioprinted tissue organs. Jakab et al. (2010) assert that it is crucial to design a fully-controllable cellular environment in order to provide a biomimetic paradigm that can place the right cells in the right place and with the right phenotype to make functional assemblies. The authors also underscore the core role of the scaffold in the tissue fabrication process, as it is the scaffold, designed from biodegradable material, that serve as the template providing the tissue with specific topological features at nano, micro and macro scale. However, the use of biodegradable scaffolds leads to the residual presence of polymer fragments, which may disrupt the normal organization of the vascular wall (Jakab et al., 2010; confirmed by; Gudapati et al., 2016). Several studies (Inzana et al., 2014; Melchels et al., 2012; Munaz et al., 2016; Shanjani et al., 2017; Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017) deal with ways to implement the scaffolds, which are absolutely crucial architectures for fabricating tissue. Wlodarczyk-Biegun and Del Campo (2017) reviewed recent achievements in bioprinting major structural proteins like collagen, silk and fibrin that confirm how porous and networked scaffolds are readily 3D printable. Note that it is possible to use different cellular types or materials simultaneously or sequentially during the same tissue engineering process. Scaffolds or hydrogels which offer the advantage of being biocompatible (Melchels et al., 2012) and providing a suitable environment for the cells due to their high water content and low polymer content (Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). There are still-unresolved technical challenges with using them (rheological properties, crosslinking density, and more), but natural compounds (like gelatin or hyaluronic acid) can be already combined with synthetic polymer network components like methacrylamide to promote crosslinking (Melchels et al., 2012).

Collagen gels in 3D bioprinting can serve in medical applications for targeted cell placement to generate a given form, and extend cellular viability. Dunn, Yarmush, Koebe, and Tompkins (1989), cited by Melchels et al. (2012), showed that hepatocytes conserved their functions for several weeks when sandwiched between two layers of collagen gel, against just a few days with a single layer. After observing similar effects, Munaz et al. (2016) concluded that the longer cellular viability conferred by this collagen hydrogel was because it keeps the cells better hydrated and better aggregated for a long time, without settling. Smith et al. (2004) developed a script to construct an artery branch of a pig heart using bovine aortic endothelial cells suspended in type-1 collagen. This data, even if it comes from the medical sector, suggests that 3D-printed foods containing collagen may hold an excellent level of hydration, which in turn would have a positive influence on their texture or mouthfeel.

2.2. In the food sector

Godoi, Prakash, and Bhandari (2016) claim that AM technology holds huge potential to fabricate foods with complex geometries, advanced textures and tailored nutritional contents, but Liu, Zhang, Bhandari, and Wang (2017) noticed only few studies dealing in the degree of precision required to make structurally-controlled foods by AM. In reality, the major difficulties for 3D printing novel foods stem from a number of factors, including material properties, printing-process parameters and post-processing parameter (methods of cooking, conservation, and so on). Even if some authors find that uptake of AM in the specialty food industry has ultimately disappointed (Gausemeier, Echterhoff, Kokoschka, & Wall, 2011, p. 103, cited by; Mawale, Kuthe, & Dahake, 2016), there are nevertheless signs of an emerging trend for culinary applications tied to the 'food design' movement, with several recent papers addressing these applications (Pallottino et al., 2016). The European project PERFORMANCE—Personalized Food using Rapid Manufacturing for the Nutrition of Elderly Consumers (Lipton, Cutler, Nigl, Cohen, & Lipson, 2015; Liu et al., 2017), had even set out to use 3D printing for the development or appealing new foods for seniors. 3D printing can thus be used to enhance certain foods and make them more attractive to consumer populations, or simply to create new forms or structures for commercial profit. The technological angle may be interesting—printer customization, open source, programming, and so on—and the societal angle may be important—food attractiveness to certain populations—but there are legitimate grounds to stop and question the real scientific impact value of studies focused exclusively on food design. For example, Zhao et al. (2018) investigated the potential reach of programming with the aim of fashioning a personalized food product that can be printed with a face from a photo.

One of leading products studied this context is chocolate (Lanaro et al., 2017; Liu et al., 2017; Zeleny & Ruzicka, 2017). A review by Godoi et al. (2016) showed that 3D printing can create complex structures made out of chocolate or sugar, provided the process can firmly control a certain number of key parameters, including feedstock vat and extrusion system temperature, nozzle geometry and height from the forming bed, rheological behaviour, among others. Adding magnesium stearate to the chocolate feedstock provide a better flowability during deposition, and thus lends the chocolate better 'printability' (Mantihal, Prakash, Godoi, & Bhandari, 2017). There are also studies on confectionery sugar, and on plant- or meat-based purees. As a rule, product rheology has to be modified using food additives, typically xanthan gum or agar-agar for plant foods or transglutaminase or gelatin for meat products (Lipton et al., 2015). However, as today's consumers tend to prefer clean label products containing as few additives as possible, blending additives into otherwise additive-free foods just to fit food to process is surely not the right way forward. Effort should instead be directed towards reworking the process to fit the food to be printed. Lipton (2017) reached this same conclusion, explaining that research in AM for the food industry is overconcerned with aesthetics factors and unconcerned with consumer health factors—yet aesthetics should only really be addressed further into the longer term, whereas it is by using AM technologies to design nutrition-controlled and/or nutrition-adapted foods that the benefits for human health could be most important. Lipton (2017) goes on to say that it would be possible to define a person's dietary energy needs and directly custom-print a food that meets their requirements. However, there is not, to our knowledge, a single study that has purposively addressed the nutritional value of 3D-printed foods, other than research just published by Derossi, Caporizzi, Azzolini & Severini (2018) on the antioxidant activity of 3D-printed fruit-based snacks.

Lipton et al. (2015) address the topic of manufacturing whole muscle tissue for human food supply, where the idea would be to remove the need to farm livestock in order to produce meat muscle and fat cells, in which case the nutritional value of these products would supposedly be identical or near-identical to 'conventional' meat. This is

one of the goals of American start-up Modern Meadow, which is working on 3D printing stem cells that, once developed, should be able to render a meat-like matrix. However, even if right now, these approaches are still in their early days, we can already see the kind of difficulties to come in the future: the economics, nutritional and organoleptic properties, industrial scale-up, nutrient inputs needed for cell culture, food safety, ethics issues, and the list goes on.

3. Impact of additive manufacturing processes on food macromolecules

Le Tohic et al. (2018) explain an AM process as subjecting the product to two types of constraints: 1) thermal treatment as the product melts, and 2) shear strain as the product extrudes through the nozzle. Process used thus has one or more effects on macromolecules making up the food product which will modify its properties. A majority of studies on compounds of interest in food applications of AM have focused on the 'printability', where printability is the set of material properties that lend a product enough stability in space to support its own weight (Godoi et al., 2016).

Although it is relevant to study a food in whole, in the case of the design of a food with therapeutic aim, it can be necessary to have elements in connection with the main macromolecules of nutritional or structural interest. Moreover, within the scope of the 3D printing of a food intended to be consumed by people within the framework of a deficiency or of a pathology, it is perfectly conceivable to resort to a basic medium having the form of a hydrogel containing meat proteins, which could be enriched in vegetable proteins, lipids and carbohydrates. In this case, understanding the interactions between the printing process and all the compounds taken one by one is fundamental.

3.1. Impact on proteins

Relatively few animal protein-rich products have been studied for applicability in AM. Exceptions include various types of pureed meat (Lipton et al., 2015), collagen (Inzana et al., 2014) and gelatin (Farag & Yun, 2014). Nevertheless, certain studies are hugely instructive on the difficulties posed by this kind of food matrix: For Godoi et al. (2016), materials should be homogenous, have appropriate flow properties for extrusion and should support its structure during and after printing process. For Wang, Zhang, Bhandari, and Yang (2018), as a mixture, each component (proteins, carbohydrates, lipids and water) can undergo changes that will influence the fusion and the plasticization of the food. For example, printability of fish surimi gels systems was the best with a sodium chloride (NaCl) concentration of 1.5 g/100 g surimi (Wang et al., 2018). Gracia-Julia, Hurtado-Pnol, Leung, and Capellas (2015) (cited by Severini, Derossi, & Azzollini, 2016) observed a better printability of beef-based preparations when the myofibrillar proteins were solubilized, due to salt adding. Electron microscopy showed that the added NaCl had led to myofibrillar protein crosslinking, enabling free amino acids to bind to the proteins, shrinking the void spaces, and changing the structure of the gel into a fine-strand network (Wang et al., 2018). This effect is maximal, and holds constant, at 1.0 g NaCl/100 g surimi. Protein printing is thus governed by the properties of the proteins, and crucially protein aggregation, which is further governed by the isoelectric point (pI). Godoi et al. (2016) assert that AM technologies can create new textures by intercalating layers of food proteins with layers of polysaccharide materials like alginate, applying temperature or mechanical stresses, or incorporating acid or base compound ingredients in the AM process to promote aggregation. Finally, Liu et al. (2017) posited that precise and accurate 3D food-based structures cannot be successfully printed without adding texturizers like hydrocolloids or gelable proteins, which has since been confirmed by Yang, Zhang, Bhandari, and Liu (2018) for 3D food printing with turkey meat.

The major structural proteins (collagen, elastin, and fibrin) have already been studied for fabrication of complex-architecture scaffolds as a step towards performing cell-by-cell deposition. The organization of these fibrous proteins, governed by alignment constraints, diameter constraints and pore structure constraints, varies according to type of tissue and has a huge influence on its mechanical properties. Fibrin is a protein produced naturally by the body where it is used to repair injury, but it can also be 3D-printed in gel form (Chia & Wu, 2015; Melchels et al., 2012). Fibrin is used in AM for fabricating scaffolds to repair bone, neurons or heart valves (Munaz et al., 2016). Collagen, which is the most abundant protein in mammals, can be bioprinted as a gel, after extraction and enzymatic digestion. According to Wlodarczyk-Biegun and Del Campo (2017), printable collagen-based solutions vary in concentration between studies, from 0.2 mg/mL up to 20 mg/mL in an ionic strength adjustment solution. Choice of concentration will depend on the mechanical properties targeted, such as maintaining tissue integrity, or the viability characteristics of the seeded cells. For example, a 1 mg/mL gel can generate cohesive and reproducible structures, provided that pH is kept under control, as a high pH can clog the printhead nozzles. Pure collagen lacks the stability needed to form a 3D structure, so it has to be combined with other polymers. Furthermore, without inducing added crosslinking, collagen will form mechanically inferior hydrogels. Crosslinking is inducible by chemical reaction using formaldehyde or glutaraldehyde or by enzymatic reaction using transglutaminase (Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). Inkjet, extrusion and laser-assisted bioprinting processes have all been mobilized for difficult-to-print collagen solutions (Inzana et al., 2014; Jakab et al., 2010; Wlodarczyk-Biegun & Del Campo, 2017). Extrusion processes can already work with multi-printhead and/or crosslinking system-coupled 3D printers (Hinton et al., 2015; Smith, Christian, Warren, & Williams, 2007). However, according to Murphy, Skardal, and Atala (2013), and Wlodarczyk-Biegun and Del Campo (2017), the main difficulties with using collagen as an extrusion-process bioink are the gel time, which is long, and swelling, which was also flagged up by Munaz et al. (2016) who concluded that despite being easily constructed for 3D structures, collagen biomaterial molecules will eventually lose shape due to swelling or dissolution, which are the main limits to further use.

As gelatin is derived from collagen, the literature often pairs the two, even if each has its own set of properties. Gelatin has nevertheless been used in many applications. Munaz et al. (2016) showed that a collagen/gelatin hydrogel synergized the properties of each, making it possible to build a hydrogel scaffold and to use the gelatin to create fluidic channels which, once the gelatin has dissolved, would leave a vascular network architecture. The thermal properties of gelatin and collagen differ: indeed, gelatin (at 10%) is solid at room temperature and liquid at 37 °C (reversible phenomenon) while the collagen must be kept in ice until printing. Moreover, gelatin is more viscous at 37 °C than collagen, which imposes to increase the pressure for the 3D printing of the collagen (Lee et al., 2014). Gelatin has been used to study bacterial cell-to-cell communication by creating crosslinked microstructures (Connell, Ritschdorff, Whiteley, & Shear, 2013), and to create scaffolds by AM for bone tissue regeneration, notably to improve the properties of ceramic scaffolds (Farag & Yun, 2014). Godoi et al. (2016) claim gelatin makes a good candidate for use as an ingredient of AM bio-inks. Gelatin gels possess a unique characteristic texture that provides appreciable mouthfeel together with good flavour perception. As stated earlier, pI has a major effect on protein structure. In the case of gelatin, at the pI, its contraction is maximal, and therefore its viscosity is minimal. This viscosity is a parameter that increases when pH changes. However, if the pH change is too sharp, the molecule will depict its maximum extension, in which case the gelatin will adopt a non-Newtonian behaviour—gelatin normally exhibits Newtonian flow in dilute solution, except when extended by charged groups. Shear also has a major effect on viscosity, and extreme shear can trigger an irreversible loss of viscosity (Godoi et al., 2016).

Both Lipton et al. (2015) and Godoi et al. (2016) talk up the use of transglutaminase to build complex geometries out of meat.

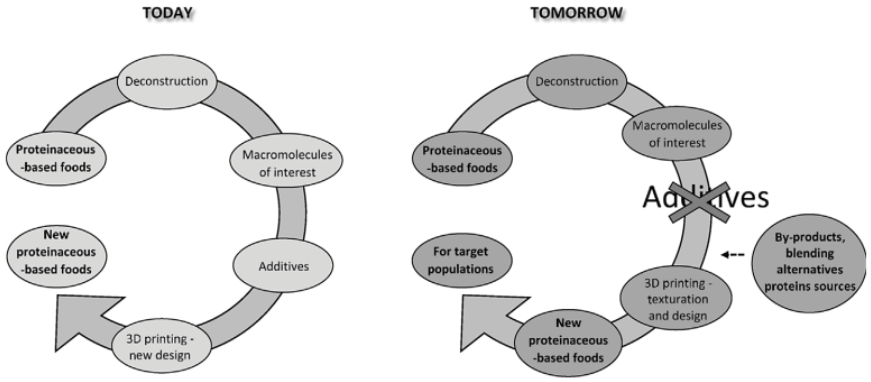


Fig. 2. Evolution under consideration for the 3D printing of new proteinaceous-based foods in the next years.

Transglutaminase is an enzyme that can catalyse new protein matrices by forming covalent bonds between lysine and glutamine residues, in a calcium-dependent reaction. This process thus manages to enzymatically crosslink proteins present in meat purees, giving rise to self-supporting hydrogels. However, the use of additives like transglutaminase, even if has potentially valuable effects in terms of the resulting mechanical properties, runs counter to the current market trend of getting back to more 'natural' foods. This means that any product developed via this kind of process is likely to meet with consumer resistance, let alone regulatory hurdles in certain countries.

The biggest challenge for printing food, then, remains getting the right kind of texture to deliver an appreciable mouthfeel. Proteins, as key structural macromolecules, are no exception to the rule. The next step forward is to engineer printing strategies that can deliver fully-controlled structures—and, if possible, without using texture-stabilizing additives (Fig. 2).

3.2. Impact on lipids

Even though 3D printing studies have tackled high-fat-content foods like chocolate, very few have investigated the effect of 3D printing on lipids and, *vice versa*, the effect of lipids on printability. To the best of our knowledge, only Le Tohic et al. (2018) and Lille, Nurmela, Nordlund, Metsä-Kortelainen, and Sozer (2018) have tackled the issue. Le Tohic et al. (2018), working with an untreated (i.e. non-extruded) cheese matrix, showed that the fat globules were round and homogeneously distributed in a continuous protein phase. A comparable structure was observed in cheese melting at 75 °C, although with bulkier fat globules due to heat ramp-induced coalescence. Cheese extrusion-printed at 4 mL/min and 75 °C showed heavily altered microstructure: the protein phase had become discontinuous and the fat globules had changed morphology—losing sphericity and gaining volume—with the appearance of interstitial fat. However, the print parameters also have a visibly major effect, since fat globule size and distribution were more homogeneous after printing at 12 mL/min (75 °C), likely due to a higher shear rate in this condition. Protein–lipid interactions are though to explain the rheological changes observed to occur in 3D-printed cheeses, i.e. a softer texture that is not as sticky due to the greater amount of surface fat released during the shear processes.

Lille et al. (2018) examined the role of lipids during food printing processes by working on milk powder as a source of both proteins and fat. They tested two formulations presenting equivalent protein contents (21% and 22%, respectively) in solutions of water with skimmed (0.4% fat) and semi-skimmed (9% fat) milk powder. They showed that the skimmed-milk formulation gave a highly-viscous and difficult-to-print paste that was too sticky to evenly deposit, and when the milk powder concentration was upped from 50% to 60%, printing became simply impossible, whatever the nozzle diameter used, whereas with the semi-skimmed formulation, even at 60% concentration, printability proved to excellent, both in terms of precision and of holding printed shape. Lille et al. (2018) explained that fat had acted as a lubricant in the extrusion system and that the biomaterial was more fluid. Note that carbohydrate content differed substantially between the two formulations (32% and 23%, respectively), which may also have influenced fluid flowrate.

Godoi et al. (2016) are optimistic about the use of lipids in AM, given that their triglyceride composition and different melting points influence meat texture and, crucially, tenderness and flavour. 3D printing methods (especially extrusion) thus have the potential for fabricating custom-textured foods. Using different-chain-length fatty acids with different degrees of unsaturation should make it possible lock down melting points, which would improve layer-on-layer adhesion, enabling the constructs to better hold their shape, in pre- and post-processing.

3.3. Impact on carbohydrates

Several studies have investigated the printability of sugar polymers. Holland, Foster, MacNaughtan, and Tuck (2018) demonstrated that cellulose (powder) is printable layer-by-layer, provided the process can firmly control the rheological properties, surface tension and density of the build material. Kim, Bae, and Park (2018), using methyl cellulose as reference biomaterial to simulate the printability of various food-inks, showed that 9%, 11% and 13% hydrocolloid concentrations were able to scaffold 28 mm-diameter cylindrical constructs with heights of 20 mm, 40 mm and 80 mm, respectively, without collapse. Working on printable pectin-based formulation, Vancauwenberghe et al. (2017) tested the effect, at otherwise-constant print parameters, of different formulations involving different stirring speeds and different concentrations of pectin, calcium chloride, bovine serum albumin (BSA) and sugar syrup. A coherent and lasting 3D structure was only achievable by adding $CaCl_2$ to partially crosslink the pectin. This study showed that pectin and sugar syrup concentrations directly influenced viscosity of the mixture, and that BSA stabilized and aerated the mixture. Vancauwenberghe et al. (2017) thus demonstrated the feasibility of 3D printing textured variable-microstructure foods.

Starch, a commonplace food additive, has also been investigated. Liu, Zhang, Bhandari, and Yang (2018) led research on 3D printing low-starch to high-starch potato purees and found that a puree had to contain at least 2% starch to be printable. In this condition, the material showed an increase in elastic limit, and better extrudability. However, at 4% starch content, despite the material comfortably holding its 3D shape and structure, it had poor extrudability due to over-high viscosity. Yang et al. (2018) also confirmed that complex sugars like potato

starch are 3D printable. Their study, which paired lemon juice and starch (at 15 g/100 g), managed to determine the optimal print-process parameters—nozzle diameter, printhead speed and extrusion rate—that fabricating smooth-surfaced constructs with zero deformation. Research by Lille et al. (2018) demonstrated, much like for lipids (see section III.2), that a 15% starch solution had better printability when the formulation contained semi-skimmed milk powder instead of skimmed-milk powder. However, feedrate through the extrusion system was dependent on the particle size of the food components, as for plant-based foods containing protein, starch and fibre, the viscous aspect of the starch, which comes from the presence of particles, quickly clogs up the system.

The papers published to date point to two big problems for 3D food printing: 1) particle size of the food components used (Lille et al., 2018), and 2) the material–material bonding mechanisms. Some upstream control over the process steps should suffice to address the first problem. On the second, authors like Liu et al. (2017) advise using additives, such as fats or blood plasma proteins, to improve solidification on cooling or crosslinking. Considering only 'natural' additives as candidates, it is easy to imagine using highly unsaturated lipids, which would also bring health benefit to consumers.

4. Effect of additive manufacturing process on the preservation of 3D-printed food

4.1. Solutions for safe fabrication

If uptake of food engineering/manufacture by AM finally takes off, then the heath–safety issue is going to come up during the process, but also during the food preservation stage, both in terms of microbiological safety (pathogenic and spoilage bacteria, fungus) and food chemistry (oxidation, newly-formed compounds). Most current 3D printers for food products were originally developed in laboratories, where easy-to-clean and/or easy-to-decontaminate design is not generally a concern. 3D printers tomorrow will need to be made in stainless steel and meet strict industry standards (Lipton et al., 2015) to prevent cross-contaminations between foods while minimizing the amount of time the 3D-printed food product is exposed to open air (presence of oxygen, high temperatures, and so on). This is confirmed by Severini, Derossi, Ricci, Caporizzi, and Fiore (2018a). They 3D-printed a fruit-and-vegetable-based smoothie and monitored its microbiological profile over 8 days when the product was stored at 5 °C in air (20% O_2 and 80% N_2) or under modified atmosphere (5% O_2 and 95% N_2). Microbial concentrations (mesophilic flora, psychrophilic microorganisms and yeasts) in the samples started high, at between 4 and 5 log CFU·g^{-1}, on Day 0, remained stable between Day 0 and Day 6 whatever the food preservation conditions, then showed a decrease at Day 8. The authors explained this initially high microbial contamination as introduced by the printer itself, via its pistons, its tubes or the extruder, as they had carefully washed the ingredients beforehand.

According to King et al. (2017), global population is expected to reach at least 9 billion by the year 2050, requiring 70% more food and requiring fully-sustainable food production systems. Meeting this food security challenge needs to be part and parcel of tackling equally big strategic issues for food research, such as the ageing demographics with a growing population of immunocompromised persons, and ring consumer demand for clean-label foods. The authors thus raised the hypothesis of 'extra-safe' food fabrication processes to make irradiated, sterilized, or pasteurized foods that are targeted to higher-risk populations. On 3D food printing, King et al. (2017) raised a number of concerns, chiefly the fact it could make everyone a food manufacturer without having any real control over the water activities and pH of their self-created food, which will necessarily bring food safety risks. Personalized diets, which we touched on earlier, are also a concern for King et al. (2017). As consumers put more focus on the nutritional aspects than on food safety, there is a risk that modifying, for example, the microbial flora of foods could create unintended food safety issues by changing their gut microflora. Clearly, the 3D food printing, where industrially or at home, needs to be tightly regulated to compensate for the evident lack of lookback experience on this technology and eliminate all risks to health.

The microbiological quality of the 3D-printed food deserves to be taken into consideration from the design of the printing process. In fact, should the raw 3D-printed food be cooked directly after the printing phase? Or, should it be conditioned as it is? These two pathways will not have the same repercussions in terms of food safety. Let us imagine a random food product, 3D-printed raw under controlled aseptic conditions. With the technology available today, we could easily directly print up its packaging, which means the packaging step could be integrated directly into the process. From there, imagine too that this packaging is edible, and so does not need to be removed to cook or eat the product. The packaging could even be made to have bacteriostatic or bactericidal action, using natural compounds (Moghimi, Aliahmadi, & Rafati, 2017; Saberi, Chockchaisawasdee, Golding, Scarlett, & Stathopoulos, 2017), in which case, as there is no further need for human intervention downstream of printing, the risk of microbiological contamination will be dramatically reduced.

The other key utility of carefully thinking out the process design is to facilitate storage of the packed–packaged product. A seamlessly controlled process, combining printing and packaging, could enable room-temperature no-refrigeration-needed storage, which could substantially reduce energy demand and prove enormously useful, especially in hot-climate countries.

4.2. The post-processing issue

Post-processing operations like drying, cooking and frying, but also pre-treatments like ultrasound and radiofrequency processing, affect the rheology of food materials, especially gel formation. For more substance-dense foods like lean beef paste, transglutaminase has to be added 0.5% by weight to maintain shape fidelity after cooking (Liu et al., 2017). Lille et al. (2018), among others, think that post-processing treatments could have a positive impact on 3D-printed foods. An example would be drying, which could increase their stiffness. Lille et al. (2018) showed that freeze-drying preserved 3D shapes much better than oven-drying, which tended to cause shrinkage. Water content of the product is an equally important parameter, as more water to remove means more risk of losing shape.

The data gap on post-processing steps in the 3D printing literature is manifest—a number of articles underline that further studies are needed to determine the most suitable pre- and post-processing (Liu et al., 2017), and that firm control of the physical-chemical, rheological and mechanical properties of the printed foods is essential (Godoi et al., 2016). Furthermore, the health–hygiene dimension has gone completely ignored. However, it is assuredly conceivable to design very precise post-processing processes, e.g. systems using a laser beam or hot air jet, which are directly coupled to the 3D printing system and which would, at the same time, ensure cooking and microbial decontamination of the food.

5. Eco-design and sustainability of additive manufacturing

5.1. Energy consumption and use of raw materials

A number of studies essentially dealing with the fabrication non-food objects, and not foods, have focused on the environmental effects of AM, or at least attempted to investigate the potential effects ahead of widespread industrial-scale uptake (Burkhart & Aurich, 2015; Jackson, Van Asten, Morrow, Min, & Pfefferkorn, 2016). This effort translates into energy (electricity) consumption assessments or into raw material savings estimates (Huang et al., 2012). Although the scholarship appears unanimous that there is raw material gain inherent to geometric

adjustment (Jin, Du, & He, 2017), there is much less consensus on the electricity consumption issue. According to Kellens, Mertens, Paraskevas, Dewulf, and Duflou (2017), the specific energy consumption for AM unit processes is one to two-fold higher than conventional machining and injection moulding processes, and according to Yoon et al. (2014), even up to a hundred times higher. However, this higher environmental impact could be minimized by optimizing the parts manufactured and making lighter parts, especially transport-sector applications for road, rail and flight industries. According to Huang et al. (2012) and Peng (2016), p. 3D printing processes generally outperform traditional manufacturing processes on environmental impacts. However, as full industry uptake of AM methods has not yet taken off, quantifying its effects in mass production remains a difficult exercise. Nevertheless, Mognol, Lepicart, and Perry (2006) have shown that optimized machine build parameters can save 40%–60% energy on certain machines. Although they reached similar conclusions, Griffiths, Howarth, De Almeida-Rowbotham, Rees, and Kerton (2016) toned down the prospects for transposing machine build parameter optimization to other processes, and highlighted the importance of developing design-specific models for AM. Implementing a more global approach based on lifecycle analysis, Le Bourhis, Kerbrat, Dembinski, Hascoet, and Mognol (2014) showed that it was entirely possible to develop environmental impact analysis tools assessing AM-specific electricity, material and fluids flows. They also highlighted that materials consumption actually had a bigger environmental impact that electricity consumption in AM processes. Watson and Taminger (2018) very recently developed a model for comparing additive *vs* subtractive manufacturing based on energy consumption. Their model accounts for the entire end-to-end fabrication-process lifecycle, from production, transport and recycling of process materials through to post-production waste processing and the energy used by the equipment on standby. Their conclusions, which were fairly disappointing on balance, underline how certain data is difficult to get, especially energy values for producing certain materials, and crucially, that the model results output cannot be readily extrapolated for studying different AM process scripts and scenarios.

Peng (2016) gave five benefits of AM for reducing carbon footprint: 1) reducing the amount of raw material in the supply chain, and thus the mining/processing of ores, 2) reducing the need to use energy-intensive processes like casting and wasteful/harmful input materials like cutting fluid for CNC machining, 3) flexibility for efficient process component design by optimizing operational performance, 4) reducing the mass weight of process components to reduce the carbon footprint in land and air transport service (which Huang et al., 2012 also mentioned), and 5) limiting logistics-factor effects by bring manufacture close to point-of-use. This last point was also flagged up by Huang et al. (2012) and Kietzmann, Pitt, and Berthon (2015) who added that this production modality would cut down on inventory by only fabricating objects on-demand. It would also eliminate the need to make spares that may never get used, particularly in the aeronautics industry. The recyclability of 3D-printed materials is another non-negligible advantage of AM that should be seen as an asset (Kietzmann et al., 2015).

The environmental impact of AM technologies has not yet been defined in any real depth, and the latest literature gives a fairly good picture of the kind of questions and contradictions raised for large-scale use. However, there are still a number of as-yet unexplored avenues for research to explore that could weed out certain approximations, primarily in energy consumption assessments, in lifecycle analyses, or in the effects of 3D printing technologies on human health, typically volatile organic compound emissions. The paper by Rejeski, Zhao, and Huang (2018) spelled out all of these factors. If we take the example of 3D extrusion printing, a process using plastics is forced to work at high temperatures, which necessarily increases energy demand, whereas food applications will work at lower temperatures, especially if the food products are 3D-printed raw, so it is perfectly conceivable that this type of product would be far more energy-efficient.

5.2. Upcycling animal by-products by additive manufacturing

To the best of our knowledge, only Lupton and Turner (2016) and Lupton (2017) touch on the fact that 3D-printed foods could be environment-positive, by reducing waste, reducing the footprint of transport via local-locale fabrication, reusing foodstuff material categorized as human-inedible, using substitute foods, or developing edible packaging.

According to FAO figures (FAO, 2012, p. 41), 33% of all food produced for human consumption globally—whether plant-based or animal-origin—gets lost or wasted, which amounts to about 1.3 billion tons per year: 30% of cereals, 20% of meat and dairy, and 45% of fruit and vegetables. In developing countries, 40% of food losses occur upstream of the supply chain, at harvest, post-harvest and processing, whereas in industrialized countries, more than 40% of food waste occur downstream of the supply chain, at retail and consumer level. Food losses and food waste can have many causes, and yet are sometimes based solely on product appearance standards (FAO, 2012, p. 41). These food loss and food waste figures also feature certain human-edible protein-rich animal by-products like offal, along with human-inedible parts of a carcass like the bones, tendons and feathers. ADEME [the French environment and energy management agency] defines a by-product as material output inevitably yet intentionally created at the same time through the same manufacturing process as the main product. Main finished product and by-product both have to meet specific characteristics, and each is fit for direct use in its own specific purpose. There is thriving research community looking at ways to up value certain animal by-products for non-food purposes using AM. A good example is Singh et al. (2017) who are working on designing biomaterials made out of poultry-industry feathers. The rationale is that feathers have such a high protein content that they can serve as base material for fabricating biocompatible tailor-made scaffolds. Given the huge pool of untapped resources, especially very-good-quality proteins, locked in animal products that are already very expensive to produce, it is perfectly logical to ask whether there are ways to squeeze every ounce of added value out of these by-products by using AM to engineer innovative functional foods.

Consumption patterns for butchered beef have changed dramatically in the past few years. More and more beef cuts are no longer being used in traditional French slow-cooked recipes like *pot-au-feu* and beef *bourguignon*. This is explained by a shift in consumer lifestyle trends, where certain recipes are now seen as taking far too long to prepare, and that is before we count the fact that consumers today only want the most tender cuts, and the big background burger trend. The upshot is that consumers today, right from their earliest age, are being taught to eat tender or even very soft food. There are two different technology pathways to re-value-stream meat, especially beef which is currently either processed as ground beef patties or undervalued as its initial tenderness is mediocre at best: 1) work on mechanical tenderization of chunked meat, by optimizing the tumbling processes (Daudin et al., 2016); 2) design innovative foods by AM. In both cases, the goal is to fashion meat products presenting a fully process-controlled texture.

Muscle is not the only carcass component that AM can upvalue. As discussed earlier, the collagen is also used, especially in the medical sector as a scaffold material (Inzana et al., 2014; Shanjani et al., 2017). This structural protein, which is considered a by-product as it comes from the skin, bones and tendons of animals, also finds an array of food-industry applications (gelatin) and could well find great usability in fabricating functional foods engineered by AM (Fig. 2). Mobilizing the structural potential of collagen via AM could be a way to develop foods based on undervalued meat or offal that have a texture suitable for young or senior citizens. Indeed, the only studies available to date on AM-engineered meat-based foods (Godoi et al., 2016; Gracia-Julia et al., 2015), used purees or ground beef, except those reporting whole-tissue fabrication by culturing stem cells (Lipton et al., 2015). Research led by Shanjani et al. (2017) to spur orthopaedic applications could

well inspire new avenues for research in the food sector. Collagen-based architectures (scaffolds) with purpose-defined motif and pore structure could serve as the build platform for fabricating texture-controlled meat-based foods.

6. Towards personalizable functional foods

Spurred by the rapid development of 3D technologies for food, authors like Wegrzyn, Golding, and Archer (2012), Sun, Zhou, Huang, Fuh, and Hong (2015a), Derossi, Caporizzi, Azzollini, and Severini (2018), Liu et al. (2017), Severini et al. (2018a) and Kousani et al. (2017) all believe that personalization holds bright prospects for the sector, which could really take off if 'home' 3D food printers become mainstream kitchen appliances—something that companies like Natural Machines, with their Foodini system, and Print2Taste, with their Bocusini system, are already offering. The paper by Liu et al. (2017) gives insight into the various applications of personalized food—for populations with medical conditions, for soldiers, for astronauts, and so on—and the inherent difficulties involved—shape fidelity for delicate objects with architectural complexities, printing speed, and so on. Among these target populations, the most widely cited in the literature is elderly people with sarcopenia or dysphagia. Thompson (2007) explains that sarcopenia is a loss of skeletal muscle mass resulting in a reduction of physical strength that can lead to loss of independence, pain, and prolongation of hospitalizations. It is projected that the global population of people aged 60 years and over will reach 1.4 billion by 2030 and 2.1 billion by 2050 (including 202 million people aged 80 years and over by 2030 and 434 million by 2050), yet there are no effective therapeutic interventions against this age-related disease. One therapeutic strategy is diet interventions to supply essential specific nutrients for this population (Luo, Lin, Li, & Liu, 2017). This is where food-sector AM can prove helpful by proposing new controlled-composition foods with adapted flavours. Dysphagia or swallowing troubles affects 15%–25% of seniors (Sun, Peng, Yan, Fuh, & Hong, 2015b), and the incidence is high in patients who have had stroke, paralysis, Parkinson's disease, the list goes on. In response, as the swallowing reflex is impaired, the food given has to be made texture-appropriate, i.e. purees and thickened fluids (Kousani et al., 2017). Food texture is thus a central concern for these ageing-related syndromes. Food design by 3D printing could make it easier for these populations to intake animal protein-packed foods that do not have to be mashed into a puree.

Derossi et al. (2018) underlined how people struggle to meet the nutritional guidelines on getting 5 fruits and vegetables per day, with only 10% of the Italian population following these recommendations. The upshot is that there are many children and teenagers with vitamin and mineral deficiencies, especially for iron and calcium, which is partly due to parents struggling to get their children to eat certain foods. Personalization by 3D printing could serve to develop foods or food supplements that are nutritionally targeted to this population by playing on tastes and texture. Derossi et al. (2018) 3D-printed a snack devised to provide the recommended nutritional requirements, and composed of the following ingredients: banana (for palatability), dried mushrooms, white beans, skimmed milk powder, lemon juice, ascorbic acid (an antioxidant), and pectin (11% to get consistency and avoid phase separation). All these ingredients were blended then 3D-printed to a set geometry while controlling for print speed and flow level. The results showed that flow level had a big effect on microstructure: low flow resulted in irregular structures and filament breakup, whereas higher flow led to better filament fusion but worse porosity (enlarged total volume). Despite running into technical problems, chiefly rheological issues, this study has proven that it was entirely possible to 3D print functional foods targeting a specific population. However, it would have been useful to capture the target population's experience of the food, especially in terms of organoleptics and acceptability.

The population segments cited above (seniors and children/teenagers) are not the only populations concerned by food customization, which also directly concerns a large number of 'subpopulations' that, together, represents a substantial mass of people: athletes, pregnant women, people with allergies, or young adults who lack either the time or the desire for cooking. However, where these new technologies really could bring transformative benefit to the masses would be to improve global food security and fight famine. There are a number of countries in the world affected by famine, and the people exposed have specific needs. AM could help these populations by maximizing the nutritional composition of foods available and pulling together different sources of nourishment, from meats to algae, lupine seed, insects, and more (Lupton, 2017).

Lipton (2017), who is primarily focused on western populations, asserts that there are two main reasons to use AM for the food industry: one is health, the other is consumer preferences. Lipton (2017) takes the example of the US population, where 4% of people have food allergies, where a substantial fraction of the population has digestive disorders (like lactose intolerance), where 60 to 70 million Americans are on dietary adjustments due to diseases (like Crohn's disease or irritable bowel syndrome), and where 69% of the population is overweight or obese—and all this without counting all the people that have difficulty chewing and/or swallowing. Lipton (2017) believes that automated (i.e. computer-controlled) mass customization of food would not only help make life easier for certain people with special food needs but also make food contamination by allergens far less likely, or even completely eliminate an ingredient.

This dimension of personalized food has been investigated in a handful of studies in continents worldwide. Examples would include, again, the European PERFORMANCE project, and research by Kousani et al. (2017) who endeavoured to find solutions for people with swallowing difficulties by developing a 3D printer that can fuse visually appetizing foods from pureed tuna, pureed pumpkin and pureed beetroot. They underline that there has been little effort made to use 3D food printing to improve the lives of people with special mealtime needs. They go on to state that 3D food printing could be used to automate the production of pureed foods and thickened liquids, improve the consistency and repeatability of foods produced in terms of texture and moisture, enhance the taste-sensory experiences in texture-modified meals, and manufacture visually attractive pureed foods and thickened liquids for people with dysphagia.

7. Consumer acceptability of an innovative process

The big consumer demand trend is towards less-processed additive-free foods. That said, how would perceptions change in the case of diagnosis-confirmed and severe malnutrition-related conditions when AM can design a supplemented food, say a protein-supplemented food, offering optimal mechanical and nutritional properties? It would then be possible to define two separate spaces for 3D food printing applications: additive-free foods for masses, and foods for therapeutic intervention that entail a higher level of food processing. However, would they still be perceived as 'foods'? And, if so, how could these foods be integrated into daily diet?

Earlier we touched on muscle tissue fabrication by culturing stem cells as potential application for 3D food printing. The studies by Siegrist and Sutterlin (2017) and Carocho, Morales, and Ferreira (2015) showed that consumers were looking for foods that were as natural as possible and had better perceptions of traditionally-farmed meat than *in vitro* meat, even if *in vitro* (cultured) meat is more environment- and animal welfare-conscious. However, these same studies also underline how consumers will evaluate a food based on symbolic but high-impact information signals. An in-depth survey on consumer attitudes to a new technology and the release of short, sharp, and straightforward information would provide consumers relevant insight on the value and utility of a new process or a new way to eat. Brunner, Dellez & Denkel (2017) tackled this objective by polling 2047 people, and learned that consumers had a poor understanding of 3D food printing. However,

they were able to test the positive effect of consumer-targeted information by explaining that the new technology could help them prepare healthy, personalized meals, all while injecting a dose of fun. This is confirmed by Lupton (2017) who argued that for a new technology or a new food to win acceptance, it must first convince the consumers of its potential and its value, while at the same time offering them reassurances. As we have seen throughout this paper, 3D food printing cannot currently do without additives (Hamilton, Alici & In Het Panhuis, 2018), chiefly texture stabilizers, especially when printing meat products. Evans, de Challemaison, and Cox (2010) revealed that in terms of prompting consumer deviation from 'natural', chemical changes were more potent than physical changes. AM today, though, aggregates both types of processing, which is precisely why 3D food printing research needs to press ahead, to attempt to minimize the use of additive inputs while further improving process output. Lupton and Turner (2016) state that 3D food printing technologies will only expand if they manage to keep the food 'natural'. This vision would enable consumers to hold onto their affective ties with food and turn a blind eye to the transgressive side of the technology. Their study also addressed what looks like the biggest segment opportunity for 3D food printing: personalization/customization. If perceptions of 3D-printed food can be oriented towards nutrition/health dimensions or towards combating malnutrition, then the technology could become an asset rather than a barrier to eating 3D-printed food. Niche markets, natural resource stewardship, food security and culinary creativity are all factors expected to drive uptake of this new type of food process.

3D food printing could well find a place as a new process in the collective consciousness, and become no more revolutionary than the microwave oven back in its day. Even if, as Brunner, Delley, and Denkel (2017) concluded, simply drawing comparisons between an old and a new technology is not enough to break down reticence and resistance to the new one, food neophobia will always crystallize, or even galvanize, in some people. Generation Z today (the demographic cohort born after the year 2000), in France alone, will represent 75% of the working population tomorrow. This new generation is set to turn today's food patterns upside down, using digital devices that will become ubiquitous. Round-the-clock home delivery, the influence of social networks on the way we eat, and diet tracking via dedicated apps will emerge new ways to feed our bodies—ways where AM is expected to flourish. Note that several surveys are already reporting that one in two 18–24-year-olds is ready to use a 3D food printer sometime in the future (The NPD Group, 2017; Kantar TNS, 2017). According to analysis by The Nielsen Company (2015), four different categories of Millennials (the demographic cohort born between 1980 and 2000, also labelled Generation Y) are set to coexist: Consumers who are environmentally conscious and concerned about the environmental impact of food-related processes will stand next to people drawn by high-tech, people concerned about their purchasing power, or people who embrace innovation yet hold onto certain more 'traditional' values. Researchers and engineers need to compose with all of these audiences in order to develop the uptake of 3D printing.

Another category of people—a multigenerational demographic this time—could also shape the way we eat, particularly meat: they are the flexitarians. Flexitarianism is a diet–lifestyle movement in which meat consumption is kept moderate, reduced or even minimized, but not entirely excluded. While around 1.7% of the French population are vegetarian and another 0.5% vegan, 34% of households are flexitarians, and 19% of flexitarians are under-35s (Kantar Worldpanel, 2016). This population, which is convinced climate change is a very real problem, could be receptive to the arguments for 3D food printing based on upcycling animal by-products and minimizing food waste. Flexitarians could also be a first-line target audience for the design of new foods built with different protein sources, as discussed earlier in this paper. The study by Noort, van Bommel, and Renzetti (2017) offers a good foundation for avenues to progress on these challenges. On top of building a pilot-scale 3D food-printing facility that can print 60 full meals per hour and using a multi-scale approach to deliver a personalized food texture, they also ran fortified composition tests. Working on plant-based products, they kept at least 80% of the main ingredient, with the other 20% allowing for fortification with proteins, fats, micronutrients, and gelling agents. The same strategy was followed by Severini, Azzolini, Albenzio & Derossi (2018b) with using edible insects as a new protein source. These efforts demonstrate that it is possible to 3D print foods composed of different sources of protein or other macromolecules. It is therefore perfectly conceivable to use a similar approach for meat-based products, by lending them added nutritional value and adapting a sustainable development approach in which meat products, fats and plant-crop proteins or proteins from algae, mushroom or insect sources could be co-incorporated.

8. Conclusion

3D printing is unquestionably a technology with a bright future in a whole number of sector spaces. The food chain industry can also use these innovative processes to tackle today's issues for tomorrow's generations. Providing custom-tailored turnkey nutritional solutions to populations that have thus far been excluded from certain markets due to their health conditions, deprived of regular access to food resources, or simply too short of buying power, represents a series of issues that, although complex and challenging, are not impossible to overcome. Resolving these issues will undoubtedly revolve around some degree of mass customization of new additive manufacturing processes, or by new product value-streaming processes. This review arrives at the conclusion that 3D food printing is on a trajectory to further progress and development. A number of products are, or soon will be, ready to go to market. Nevertheless, the meat-based foods problem, where the main technological hurdle remains texturizing the printed foods, has yet to be resolved. The major challenge for the coming years will be to work on using 3D printing to develop meat products or products blending alternative protein sources that remain perfectly structured without having to use additives. A substantive work remains to be done at this level by seeking to increase the cohesion between the layers of the product by optimizing the 3D-printing parameters, but also by adapting the physical and/or chemical properties of the printed product with no adding of chemical substances. Once this step is completed, research will be essential to enable the manufacture of healthy foods, both from a microbiological and chemical point of view. To achieve this, tomorrow's 3D printers for foodstuffs have to be think from now so that their design accounts for easy cleaning and integration of a post-processing system (cooking, drying …), and why not, a system of packaging, in order to limit the handling of product and thus the risks of external contamination. From a chemical point of view, the printing times being, for the moment, relatively long, it is therefore necessary to pay careful attention to the immediate environment of the food being printed in order to preserve its various constituents from the oxidation phenomena (printing under nitrogen atmosphere …). If all these various challenges are raised, the manufacture by 3D-printing of microbiologically and chemically stable foodstuffs that could be then conserved at room temperature will then be a reality, thus leading to a real sustainable development approach. The final step will then be to garner consumer acceptance for these 3D-printed foods. If consumers are properly briefed on the methods employed and the benefits offered, then we see no real barriers to wider acceptability, especially among the future generations coming of age, many of whom will likely embrace both flexitarianism and hyperconnectedness. Today, the signs and signals suggest additive manufacturing is about to usher in the next new industrial revolution. So why not in food manufacturing? Time will tell.

Declarations of interest

None.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

The authors thank ATT (an ISO 9001:2008-certified technical and scientific translation services company) for proofreading the manuscript.

References

Almela, T., Al-Sahaf, S., Brook, I. M., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Fahimipour, F., et al. (2018). 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer. *Tissue and Cell, 52*, 71–77.

Almela, T., Brook, I. M., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Fahimipour, F., Tahriri, M., et al. (2017). Simulation of cortico-cancellous bone structure by 3D printing of bilayer calcium phosphate-based scaffolds. *Bioprinting, 6*, 1–7.

Arelr, M., Xu, Y., Harrison, D., & Fyson, J. (2017). 3D printing of highly flexible supercapacitor designed for wearable energy storage. *Materials Science and Engineering: B, 226*, 29–38.

Attaran, M. (2017). The rise of 3-D printing: The advantages of additive manufacturing over traditional manufacturing. *Business Horizons, 60*(5), 677–688.

Bégin-Drolet, A., Dussault, M.-A., Fernandez, S. A., Larose-Dutil, J., Leask, R. L., Hoesli, C. A., et al. (2017). Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. *Additive Manufacturing, 15*, 29–39.

Berman, B. (2012). 3-D printing: The new industrial revolution. *Business Horizons, 55*(2), 155–162.

Bose, S., Ke, D., Sahasrabudhe, H., & Bandyopadhyay, A. (2018). Additive manufacturing of biomaterials. *Progress in Materials Science, 93*, 45–111.

Brunner, T. A., Delley, M., & Denkel, C. (2018). Consumer attitudes and attitude change in printed foods in 3D food quality and preferences. *Food Quality and Preference, 68*, 389–396. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.010.

Burkhart, M., & Aurich, J. C. (2015). Framework to predict the environmental impact of additive manufacturing in the life cycle of a commercial vehicle. *Procedia CIRP, 29*, 408–413.

Campbell, T., Williams, C., Ivanova, O., & Garett, B. (2011). Could 3D printing change the world? Technologies, potential, and implications of additive manufacturing. *Strategic foresight report* (pp. 16). Atlantic Council.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology, 45*(2), 284–295.

Chen, X., Li, J., Cheng, X., He, B., Wang, H., & Huang, Z. (2017). Microstructure and mechanical properties of the austenitic stainless steel 316L fabricated by gas metal arc additive manufacturing. *Materials Science and Engineering A, 703*, 567–577.

Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering, 9*(1), 4.

Connell, J. L., Ritschdorff, E. T., Whiteley, M., & Shear, J. B. (2013). 3D printing of microscopic bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*(46), 18380–18385.

Daudin, J.-D., Sharedeh, D., Favier, R., Portanguen, S., Auberger, J.-M., & Kondjoyan, A. (2016). Design of a new laboratory tumbling simulator for chunked meat: Analysis, reproduction and measurement of mechanical treatment. *Journal of Food Engineering, 170*, 83–91.

Derossi, A., Caporizzi, R., Azzollini, D., & Severini, C. (2018). Application of 3D printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. *Journal of Food Engineering, 220*, 65–75.

Dunn, J. C. Y., Yarmush, M. L., Koebe, H. G., & Tompkins, R. G. (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry long-term culture in a sandwich configuration. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 3*, 174–177.

Evans, G., de Challemaison, B., & Cox, D. N. (2010). Consumers' ratings of the natural and unnatural qualities of foods. *Appetite, 54*(3), 557–563.

FAO (2012). *Pertes et gaspillages alimentaires dans le monde - ampleur, causes et prévention. Rome, Italy.*

Farag, M. M., & Yun, H.-S. (2014). Effect of gelatin addition on fabrication of magnesium phosphate-based scaffolds prepared by additive manufacturing system. *Materials Letters, 132*, 111–115.

Ford, S., Mortara, L., & Minshall, T. (2016). The emergence of additive manufacturing: Introduction to the special issue. *Technological Forecasting and Social Change, 102*, 156–159.

Gausemeier, J., Echterhoff, N., Kokoschka, M., & Wall, M. (2011). *Thinking ahead the future of additive manufacturing – analysis of promising industries.* Germany: University of Paderborn, DMRC.

Godoi, F. C., Prakash, S., & Bhandari, B. R. (2016). 3d printing technologies applied for food design: Status and prospects. *Journal of Food Engineering, 179*, 44–54.

Goole, J., & Amighi, K. (2016). 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics, 499*(1–2), 376–394.

Gracia-Julia, A., Hurtado-Pnol, S., Leung, A., & Capellas, M. (2015). Extrusion behavior of food materials in a 3D Food Printer. Pectin based bio-ink formulations for 3-D printing of porous foods. *Proceedings of the 29th EFFoST international, 10-12 november, athens: Vol. 2*, (pp. 1740–1741).

Griffiths, C. A., Howarth, J., De Almeida-Rowbotham, G., Rees, A., & Kerton, R. (2016). A design of experiments approach for the optimisation of energy and waste during the production of parts manufactured by 3D printing. *Journal of Cleaner Production, 139*, 74–85.

Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C., & Spence, D. M. (2014). Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Analytical Chemistry, 86*(7), 3240–3253.

Gudapati, H., Dey, M., & Ozbolat, I. (2016). A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials, 102*, 20–42.

Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., et al. (2010). Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials, 31*(28), 7250–7256.

Hamilton, C. A., Alici, G., & in het Panhuis, M. (2018). 3D printing vegemite and marmite: Redefining "breadboards". *Journal of Food Engineering, 220*, 83–88.

Heigel, J. C., Michaleris, P., & Reutzel, E. W. (2015). Thermo-mechanical model development and validation of directed energy deposition additive manufacturing of Ti–6Al–4V. *Additive Manufacturing, 5*, 9–19.

Hinton, T. J., Jallerat, Q., Palchesko, R. N., Park, J. H., Grodzicki, M. S., Shue, H.-J., et al. (2015). Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Science Advances, 1*(9).

Holland, S., Foster, T., MacNaughtan, W., & Tuck, C. (2018). Design and characterisation of food grade powders and inks for microstructure control using 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 12–19.

Huang, S. H., Liu, P., Mokasdar, A., & Hou, L. (2012). Additive manufacturing and its societal impact: A literature review. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 67*(5–8), 1191–1203.

Icten, E., Purohit, H. S., Wallace, C., Giridhar, A., Taylor, L. S., Nagy, Z. K., et al. (2017). Dropwise additive manufacturing of pharmaceutical products for amorphous and self-emulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics, 524*(1–2), 424–432.

Inzana, J. A., Olvera, D., Fuller, S. M., Kelly, J. P., Graeve, O. A., Schwarz, E. M., et al. (2014). 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials, 35*(13), 4026–4034.

Jackson, M. A., Van Asten, A., Morrow, J. D., Min, S., & Pfefferkorn, F. E. (2016). A comparison of energy consumption in wire-based and powder-based additive-subtractive manufacturing. *Procedia Manufacturing, 5*, 989–1005.

Jakab, K., Norotte, C., Marga, F., Murphy, K., Vunjak-Novakovic, G., & Forgacs, G. (2010). Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication, 2*(2)https://doi:10.1088/1758-5082/2/2/022001.

Jin, Y., Du, J., & He, Y. (2017). Optimization of process planning for reducing material consumption in additive manufacturing. *Journal of Manufacturing Systems, 44*, 65–78.

Kantar TNS (2017). *FoodTech: les Millenials révolutionnent l'alimentation.* www.mbamci.comhttps://mbamci.com/foodtech-millenials-et-alimentation/.

Kantar Worldpanel (2016). A la découverte des « flexitariens » : Qui sont ces foyers qui souhaitent réduire leur consommation de protéines animales ? *Newsletter, 48*https://www.kantarworldpanel.com/fr/A-la-une/Newsletter-48.

Kellens, K., Mertens, R., Paraskevas, D., Dewulf, W., & Duflou, J. R. (2017). Environmental impact of additive manufacturing processes: Does AM contribute to a more sustainable way of part manufacturing? *Procedia CIRP, 61*, 582–587.

Kietzmann, J., Pitt, L., & Berthon, P. (2015). Disruptions, decisions, and destinations: Enter the age of 3-D printing and additive manufacturing. *Business Horizons, 58*(2), 209–215.

Kim, H. W., Bae, H., & Park, H. J. (2018). Reprint of: Classification of the printability of selected food for 3D printing: Development of an assessment method using hydrocolloids as reference material. *Journal of Food Engineering, 220*, 28–37.

King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaras, D., Fox, E. M., et al. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science & Technology, 68*, 160–175.

Kousani, A. Z., Adams, S., Whyte, D. J., Oliver, R., Hemsley, B., Palmer, S., et al. (2017). 3D printing of food for people with swallowing difficulties. In S. o. E. P. K. Collins (Ed.). *DesTech Conference Proceedings. The International Conference on Design and Technology* (pp. 23–29). Australia: Deakin University Deakin University and Ian Gibson, School of Engineering, Deakin University.

Krujatz, F., Lode, A., Seidel, J., Bley, T., Gelinsky, M., & Steingroewer, J. (2017). Additive biotech-chances, challenges, and recent applications of additive manufacturing technologies in biotechnology. *New Biotech, 39*(Pt B), 222–231.

Lanaro, M., Forrestal, D. P., Scheurer, S., Slinger, D. J., Liao, S., Powell, S. K., et al. (2017). 3D printing complex chocolate objects: Platform design, optimization and evaluation. *Journal of Food Engineering, 215*, 13–22.

Le Bourhis, F., Kerbrat, O., Dembinski, L., Hascoet, J.-Y., & Mognol, P. (2014). Predictive model for environmental assessment in additive manufacturing process. *Procedia CIRP, 15*, 26–31.

Le Tohic, C., O'Sullivan, J. J., Drapala, K. P., Chartrin, V., Chan, T., Morrison, A. P., et al. (2018). Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering, 220*, 56–64.

Lee, V. K., Lanzi, A. M., Haygan, N., Yoo, S. S., Vincent, P. A., & Dai, G. (2014). Generation of multi-scale vascular network system within 3D hydrogel using 3D bio-printing technology. *Cellular and Molecular Bioengineering, 7*(3), 460–472.

Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S., & Sozer, N. (2018). Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 20–27.

Lipton, J. I. (2017). Printable food: The technology and its application in human health. *Current Opinion in Biotechnology, 44*, 198–201.

Lipton, J. I., Cutler, M., Nigl, F., Cohen, D., & Lipson, H. (2015). Additive manufacturing for the food industry. *Trends in Food Science & Technology, 43*(1), 114–123.

Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B., & Wang, Y. (2017). 3D printing: Printing precision and

application in food sector. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 83–94.
Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B., & Yang, C. (2018). Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 76–82.
Luo, D., Lin, Z., Li, S., & Liu, S.-J. (2017). Effect of nutritional supplement combined with exercise intervention on sarcopenia in the elderly: A meta-analysis. *International Journal of Nursing Science, 4*(4), 389–401.
Lupton, D. (2017). 'Download to delicious': Promissory themes and sociotechnical imaginaries in coverage of 3D-printed food in online news sources. *Futures, 93*, 44–53.
Lupton, D., & Turner, B. (2016). 'Both fascinating and disturbing': Consumer responses to 3D food printing and implications for food activism. In K. E. Tanja Schneider, C. Dolan, & U. Stanley (Eds.). *Digital food activism* (pp. 17). London: Routledge.
Mantihal, S., Prakash, S., Godoi, F. C., & Bhandari, B. (2017). Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 44*, 21–29.
Mawale, M. B., Kuthe, A. M., & Dahake, S. W. (2016). Additive layered manufacturing: State-of-the-art applications in product innovation. *Concurrent Engineering, 24*(1), 94–102.
Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J., & Hutmacher, D. W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science, 37*(8), 1079–1104.
Meteyer, S., Xu, X., Perry, N., & Zhao, Y. F. (2014). Energy and material flow analysis of binder-jetting additive manufacturing processes. *Procedia CIRP, 15*, 19–25.
Moghimi, R., Aliahmadi, A., & Rafati, H. (2017). Antibacterial hydroxypropyl methyl cellulose edible films containing nanoemulsions of Thymus daenensis essential oil for food packaging. *Carbohydrate Polymers, 175*, 241–248.
Mognol, P., Lepicart, D., & Perry, N. (2006). Rapid prototyping: Energy and environment in the spotlight. *Rapid Prototyping Journal, 12*(1), 26–34.
Munaz, A., Vadivelu, R. K., St John, J., Barton, M., Kamble, H., & Nguyen, N.-T. (2016). Three-dimensional printing of biological matters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 1*(1), 1–17.
Murphy, S. V., Skardal, A., & Atala, A. (2013). Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 101*(1), 272–284.
Noort, M., van Bommel, K., & Renzetti, S. (2017). 3D-Printed cereal foods. *Cereal Foods World, 62*(6), 272–277.
Pallottino, F., Hakola, L., Costa, C., Antonucci, F., Figorilli, S., Seisto, A., et al. (2016). Printing on food or food printing: A review. *Food and Bioprocess Technology, 9*(5), 725–733.
Peng, T. (2016). Analysis of energy utilization in 3D printing processes. *Procedia CIRP, 40*, 62–67.
Pinna, C., Ramundo, L., Sisco, F. G., Angioletti, C. M., Taisch, M., & Terzi, S. (2017). Additive manufacturing applications within food industry: An actual overview and future opportunities. *XXI summer school 'francesco turco"- industrial systems engineering* (pp. 7). .
Rejeski, D., Zhao, F., & Huang, Y. (2018). Research needs and recommendations on environmental implications of additive manufacturing. *Additive Manufacturing, 19*, 21–28.
Saberi, B., Chockchaisawasdee, S., Golding, J. B., Scarlett, C. J., & Stathopoulos, C. E. (2017). Characterization of pea starch-guar gum biocomposite edible films enriched by natural antimicrobial agents for active food packaging. *Food and Bioproducts Processing, 105*, 51–63.
Severini, C., Azzollini, D., Albenzio, M., & Derossi, A. (2018b). On printability, quality and nutritional properties of 3D printed cereal based snacks enriched with edible insects. *Food Research International, 106*, 666–676.
Severini, C., Derossi, A., & Azzollini, D. (2016). Variables affecting the printability of foods: Preliminary tests on cereal-based products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 38*, 281–291.
Severini, C., Derossi, A., Ricci, I., Caporizzi, R., & Fiore, A. (2018a). Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *Journal of Food Engineering, 220*, 89–100.
Shanjani, Y., Kang, Y., Zarnescu, L., Ellerbee Bowden, A. K., Koh, J. T., Ker, D. F. E., et al. (2017). Endothelial pattern formation in hybrid constructs of additive manufactured porous rigid scaffolds and cell-laden hydrogels for orthopedic applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 65*, 356–372.
Shimizu, S., Fujii, H. T., Sato, Y. S., Kokawa, H., Sriraman, M. R., & Babu, S. S. (2014). Mechanism of weld formation during very-high-power ultrasonic additive manufacturing of Al alloy 6061. *Acta Materialia, 74*, 234–243.
Siegrist, M., & Sutterlin, B. (2017). Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat. *Appetite, 113*, 320–326.
Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P., & Jabbour, G. E. (2010). Inkjet printing-process and its applications. *Advanced Materials, 22*(6), 673–685.
Singh, S., & Ramakrishna, S. (2017). Biomedical applications of additive manufacturing: Present and future. *Current Opinion in Biomedical Engineering, 2*, 105–115.
Singh, S., Ramakrishna, S., & Singh, R. (2017). Material issues in additive manufacturing: A review. *Journal of Manufacturing Processes, 25*, 185–200.
Smith, C. M., Christian, J. J., Warren, W. L., & Williams, S. K. (2007). Characterizing environmental factors that impact the viability of tissue-engineered constructs fabricated by a direct-write bioassembly tool. *Tissue Engineering, 13*(2), 373–383.
Smith, C. M., Stone, A. L., Parkhill, R. L., Stewart, R. L., Simpkins, M. W., Kachurin, A. M., et al. (2004). Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering, 10*(9–10), 1566–1576.
So, E., Mandas, V. H., & Hlad, L. (2018). Large osseous defect reconstruction using a custom three-dimensional printed titanium truss implant. *Journal of Foot and Ankle Surgery, 57*(1), 196–204.
Sun, J., Peng, Z., Yan, L., Fuh, J. Y. H., & Hong, G. S. (2015b). 3D food printing—an innovative way of mass customization in food fabrication. *International Journal of Bioprinting, 1*(1), 27–38.
Sun, J., Zhou, W., Huang, D., Fuh, J. Y. H., & Hong, G. S. (2015a). An overview of 3D printing technologies for food fabrication. *Food and Bioprocess Technology, 8*(8), 1605–1615.
Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D., & Lin, L.-y. (2018). Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *Journal of Food Engineering, 220*, 1–11.
Takezawa, A., & Kobashi, M. (2017). Design methodology for porous composites with tunable thermal expansion produced by multi-material topology optimization and additive manufacturing. *Composites Part B: Engineering, 131*, 21–29.
The Nielsen Company (2015). Zoom sur les Millenials. www.nielsen.com.
The NPD Group (2017). Millenials : Les 18-34 ans redessinent la restauration de demain. www.npdgroup.fr.
Thompson, D. D. (2007). Aging and sarcopenia. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 7*(4), 344–345.
Vancauwenberghe, V., Katalagarianakis, L., Wang, Z., Meerts, M., Hertog, M., Verboven, P., et al. (2017). Pectin based food-ink formulations for 3-D printing of customizable porous food simulants. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 42*, 138–150.
Wang, L., Zhang, M., Bhandari, B., & Yang, C. (2018). Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *Journal of Food Engineering, 220*, 101–108.
Watson, J. K., & Taminger, K. M. B. (2018). A decision-support model for selecting additive manufacturing versus subtractive manufacturing based on energy consumption. *Journal of Cleaner Production, 176*, 1316–1322.
Wegrzyn, T. F., Golding, M., & Archer, R. H. (2012). Food layered manufacture: A new process for constructing solid foods. *Trends in Food Science & Technology, 27*(2), 66–72.
Wlodarczyk-Biegun, M. K., & Del Campo, A. (2017). 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials, 134*, 180–201.
Yang, F., Zhang, M., Bhandari, B., & Liu, Y. (2018). Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology, 87*, 67–76.
Yoon, H.-S., Lee, J.-Y., Kim, H.-S., Kim, M.-S., Kim, E.-S., Shin, Y.-J., et al. (2014). A comparison of energy consumption in bulk forming, subtractive, and additive processes: Review and case study. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology, 1*(3), 261–279.
Zeleny, P., & Ruzicka, V. (2017). The design of the 3d printer for use in gastronomy. *Modern Machinery (MM) Science Journal*, 1744–1747.
Zhao, H., Wang, J., Ren, X., Li, J., Yang, Y.-L., & Jin, X. (2018). Personalized food printing for portrait images. *Computers & Graphics, 70*, 188–197.

Annexe V 5.

Article « Portanguen et al. (2022) Foods »

foods

MDPI

Article

Development of a 3D Printer for the Manufacture of Functional Food Protein Gels

Stéphane Portanguen *, Pascal Tournayre, Paul Gibert, Selma Leonardi, Thierry Astruc and Pierre-Sylvain Mirade

Université Clermont Auvergne, INRAE, UR370 Qualité des Produits Animaux (QuaPA), 63122 Saint-Genès-Champanelle, France; pascal.tournayre@inrae.fr (P.T.); paul.gibert@etu.utc.fr (P.G.); selma.leonardi@etu.utc.fr (S.L.); thierry.astruc@inrae.fr (T.A.); pierre-sylvain.mirade@inrae.fr (P.-S.M.)

* Correspondence: stephane.portanguen@inrae.fr

Abstract: The use of additive manufacturing is growing in multiple sectors, including food, and its scientific and technological challenges form the subject of much ongoing research. One current hurdle is the implementation of the 3D printing process for meat protein matrices. This article gives an overview of the various 3D printers used to study the printability properties of foods and presents the development of a 3D printer designed to print food protein gels. Printhead development (flow rate and temperature control) and the modifications made to the printing plate (temperature control) are described and discussed in relation to the constraints highlighted in a first prototype. A second, developed prototype was characterized and validated. This last phase showed perfect control of the prototype in the purging of the extrusion system, the flow rate, the calibration and the displacement of the printhead, along with the temperatures at both printhead and plate. A study of the printed gels also revealed good repeatability of the printed gel geometry and pointed to new ways to improve the process. In the near future, the protein gels that will be printed from this prototype will serve as a base for texturizer-free functional foods for people with chewing difficulties.

Keywords: additive manufacturing; personalization; 3D food printing; protein; customization; food design

check for updates

Citation: Portanguen, S.; Tournayre, P.; Gibert, P.; Leonardi, S.; Astruc, T.; Mirade, P.-S. Development of a 3D Printer for the Manufacture of Functional Food Protein Gels. *Foods* **2022**, *11*, 458. https://doi.org/10.3390/foods11030458

Academic Editors: Danijela Bursać Kovačević and Harjinder Singh

Received: 13 December 2021
Accepted: 24 January 2022
Published: 3 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affil- iations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Additive manufacturing (or 3D printing) is a technology of major interest in multiple sectors including mechanical engineering, medicine, and the food industry [1,2]. For this last sector, two factors can explain the trend: (i) a search for novelty in sensory properties, and (ii) personalization of diet and the design of functional foods for target populations [3], such as older people with chewing difficulties [4,5]. Some authors (e.g., [6]) even affirm that the personalization of diet could result in the printing of food, the formulation and design of which would have been previously adjusted on the basis of data obtained on the specific health status of each individual. To pursue novelty, turnkey commercial printers are available. Several dozen 3D food printers are currently marketed (ChefJet from 3D Systems, Foodini from Natural Machines, Chef3D from BeeHex, etc.). Costs range from a few hundred to several thousand euros/dollars depending on the technical level. Their use is restricted, often being oriented towards culinary design. Nevertheless, these machines are used in many laboratory studies, for example, to determine the rheological or flow properties of food matrices (chocolate, pasta, etc.) or how well the geometry of a printed food corresponds to the original geometry preset in a numerical model [7–9]. The range of food printers has been extended to include multi-ingredient machines, which can be used to print more elaborate foodstuffs. However, this type of machine does not ensure a suitable food balance for users because some foods are not printable, such as meat products or most fruits and vegetables. Only products with a low melting point, rich in

polysaccharides or naturally gelling can be readily printed (chocolate, biscuit dough, dairy products, cereals, etc.).

To personalize diet and design functional foods of nutritional interest based on proteins of meat origin or/and plant extracts, the right machines have not yet been fully developed. Even so, some studies [10–13] have focused on the development or modification of prototypes to print a specific single- or multi-ingredient product, but here too, most often of vegetable origin (sugar, chocolate, pasta, etc.). One of the main difficulties lies in controlling the quantity of matrix deposited as a function of the speed of movement of the printhead. However, conventional 3D printers have the advantage of being easily modified and adaptable to the constraints of the food matrices to be printed. The fact that most of them are often open-source and inexpensive is why most laboratory work on 3D food printing is done on this type of machine.

Table 1 summarizes the main printing methods described in the literature together with the main printing settings and variables. These printers are most often designed on the following model: a pressure system is made up of a mechanical (worm screw) or pneumatic syringe pump, with or without temperature regulation, that delivers a set quantity of a semi-viscous food ink through a nozzle or a needle, while controlling the speed of movement and the extrusion rate. A description of the main 3D food printing methods is available in a previously published article [2]. Changes made by users are therefore mainly at the level of the printhead, where the extrusion system is replaced by a type of syringe pump [14]. The printing plates are only very seldom modified. Technically, both commercial food printers and lab-scale modified printers all operate on the same principle of thermal regulation, namely heating of the printhead (as most machines use extrusion) and heating of the printing plate to be able to cook the food if necessary. To our knowledge, to increase the solidification speed of the printed matrices, only forced air cooling systems exist, directly at the nozzle [10]. None of these systems allow the printing plate to be cooled to facilitate mass setting of ingredients. This problem was highlighted by In et al. [15], who found that a mixture of gelatin, sugar, and citric acid could not be printed at 24 °C because the gel failed to set. The authors had to use a device cooled to −2 °C for 1 min between each 0.2 mm layer to increase the firmness of the gel and allow the next layer to be applied. Poor ergonomics coupled with cooling times and general process implementation of this order are incompatible with food-grade 3D printing. This justifies the integration of a self-regulating cooling device directly at the level of the printing plate. Such modified printers are well-suited to research and optimization, but not to the manufacture of food for human consumption because of cleaning and disinfection problems [5]. It is noteworthy that, to date, very few studies have evaluated these health aspects.

Table 1. Main methods of 3D printing of food products and their associated settings and operating variables. Only studies with numerical data have been included.

Printing Technology	Type of Food	Print Speed ($mm.s^{-1}$)	Travel Speed ($mm.s^{-1}$)	Extrusion Rate ($mL.min^{-1}$)	Nozzle/Needle Diameter (mm)	Infill Level (%)	Layer Thickness (mm)	Ref.
Syringe pump made of stainless steel (1.3 b pressure)	Mixture of fruits/vegetables + fish collagen	11–21	20	/	1.2	25	1.1	[5]
Syringe pump	Sugar	20–50	/	/	1	/	/	[10]
Coaxial extrusion	Pectin/$CaCl_2$	10	200	0.34	0.838	85	0.838	[14]
Syringe pump	Mashed potatoes/strawberry juice gel	25	/	/	/	40–100	1.2	[16]
Syringe pump	Various foods (viscosity $1.1.10^{-3}$ to 10^3 Pa.s)	15–20	15–20	/	/	/	/	[17]
Piston (4 b pressure)	Cereal dough	30	50	/	0.6	10–20	0.3–0.5	[18]
Auger mixer + conveyor	Lemon juice gel + potato starch	30	/	1.44	1	/	/	[19]
Auger mixer + conveyor	Surimi	28	/	0.18	2	/	/	[20]

Meat products are ill-suited to food 3D printing. The absence of polysaccharides in their matrix impedes mass setting, and the gelling capacity of muscle proteins is limited in the physical and chemical conditions of the raw material (ionic strength, temperature, etc.) [21]. All the currently published studies on animal products, without exception, have used texturizing additives to ensure matrix printability. As an example, Wang et al. [20] printed surimi (containing about 10% starch—average proportion observed, not indicated in the study in question), provided 1.5% sodium chloride was added to solubilize the proteins (even 2.5% for [22]). Yang et al. [23] found the same conclusion with 3D printed chicken meat. According to these authors, a salt addition of 2.5% was necessary for a correct extrusion because it improved cohesion between the printed layers by increasing the water holding capacity and the solubilization of the myofibrillar proteins, thus allowing the structuring of a denser and tighter gel network. Another example is found in the study of Dick et al. [24], who sought to add value to low commercial value muscles by 3D printing. It turns out that printing meat products requires the use of additives such as transglutaminase or guar gum [25] to achieve a viscosity compatible with the printing process. One way to overcome this ultra-formulation is to control the printing process. This is the subject of the present study. The authors describe here how they modified a commercial FDM printer to perfectly control the movement of the printhead and the flow of edible ink at the nozzle, together with the temperatures during printing by thermal regulation at the printhead, but most of all, cold regulation at the printing plate. This last constitutes an original addition to the literature. The authors also studied the effect of these variables on the mechanical strength of a gelatin-based model medium only composed of denatured collagen using this same lab-scale modified 3D printer. Only the feasibility of the machine was investigated in the present study in order to test, in particular, its ability to print a model protein gel in a reproducible way in terms of geometry and texture.

2. Materials and Methods

2.1. 3D Printers and Extruders

The work presented here concerns the development of a 3D food printer. For this purpose, a first prototype was designed that went on to serve as a basis for the development of a second one, fully described here. The printer supporting the first prototype was a Prusa i3 (Prusa, Prague, Czech Republic). The chosen printer to make into our second prototype was a Ghost1 (Jinhua Flyingbear Intelligent Technology, Jinhua, China). It cost € 320 and was delivered disassembled. This enables the user to discover how the machine works, facilitating future modifications. In this model, the printhead moves along the x- and y-axes. The printing plate ensures the z displacement, leaving ample space to accommodate a custom-designed printhead.

To control the shrinkage of the sample during extrusion (control of the quantity applied), the original extruder (Ghost1) was replaced by a precision volumetric dosing system: Precifluid® (Poly Dispensing Systems, Orgeval, France). With a volume of 10 cm^3, it has the advantage of being able to produce a liquid or semi-solid material continuously or sequentially, providing a thrust capacity of >500,000 mPa.s, a volume per step of 0.000473 cm^3, and a minimum delivered volume of 0.06 µL.

2.2. Design Method

The extrusion and deposition systems were designed using two approaches. The first approach was the design and production of the parts necessary for the integration of the various essential organs by 3D printing of polymers. All the spare parts used to modify the Ghost1 printer were drawn on the Inventor®® software (Autodesk®®, San Francisco, CA, USA). They were then printed with a resolution of 100 µm (nozzle 0.4 mm) in PLA (polylactic acid) or PETG (polyethylene terephthalate glycol) on a 3D Stream30 Pro MK2 printer (Volumic, Nice, France). The slicing software used to generate the G-codes was Simplify3D®® 4.1 (Cincinnati, OH, USA). All the software dedicated to device design was

installed on a PC (DELL Precision 3630, Intel Core i9-9900K, 64GB RAM, SSD 1 TB, graphics card NVIDIA Quadro RTX4000).

The second approach was the integration and control of the various components of the 3D printing system described in Section 3.2.2, namely the Precifluid® device, the heating ring, the cooling printing plate composed of the Peltier module and the heat sink, and the optical barrier.

2.3. Characterization of the 3D Printer

Major modifications were made to the 3D printer, at both mechanical and electronic levels. It was therefore necessary to make sure that the main components of the device were not negatively impacted by these modifications (e.g., drift of the deposited volume according to the heating temperature of the printhead) and that these modifications yielded gels that were repeatable in shape and hardness.

2.3.1. Effect of Thermal Control of the Printhead on the Flow Rate of the Extruder

The mass flow rate is ensured by the servocontrol of the Precifluid® volumetric dosing system. However, this device undergoes temperature variations of up to 60 °C due to the heat conduction induced by the heating ring used to keep the protein gels supercooled. To ensure the accuracy of the mass flow rate delivered during printing, control of the delivered flow rate was implemented.

As the density of the protein gels was a priori unknown, the tests were performed with water. According to the manufacturer, the Precifluid® system is insensitive to viscosity variations due to its electromechanical movement. One milliliter of water was extruded in 0.2 mL steps at the following temperatures: 20, 40, and 60 °C. Each series of extrusion was repeated 10 times. After extrusion, the quantities of water delivered were weighed using a precision balance (AB204-S, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) that had been checked and regularly calibrated.

2.3.2. Effect of the 3D Printing Process on the Print Repeatability of Protein Gels

Test gel composition. The gelatin used (type A—200 bloom—13.78% moisture) came from pigskin (Caldic Ingredients, Rognac, France). The water content of the gel was set at 3 kg water/kg dry matter (i.e., for a volume of about 20 mL, 5 g of powdered gelatin plus 16.56 g of ultrapure water). The whole was left at 50 °C, with stirring, until complete dissolution. The gel was poured into the syringe of the Precifluid® dosing system and maintained at 50 °C by the heating ring until final extrusion. Gels were 3D-printed as 20 mm × 10 mm cylinders from an STL format file converted to G-code via 'Repetier-Host' software containing the CuraEngine slicer (Hot-World Gmbh & Co. KG, Willich, Germany).

Textural measurements. As the texture of the printed product is a crucial property, it was necessary to ensure the repeatability of the printer in terms of homogeneity of the deposited layers and internal filling. For this purpose, mechanical measurements were made using a texturometer (EZ-Test LX, Shimadzu, Noisiel, France). According to Schreuders et al. [26], instrumental techniques provide objective information on different structural variables and so can be used meaningfully to characterize the structure of meat products. The method chosen for this study was texture profile analysis (TPA) with the following conditions: sample diameter 20 mm, probe diameter 50 mm, surface detection at 0.5 N, displacement speed 20 mm/min, and double compression at 50% of the sample height. Only the hardness values corresponding to the maximum force measured at each compression were exploited. Prior to the measurements, the gel samples were conditioned at 4 °C for 12 h to ensure optimal solidification and then placed at room temperature 2 h before each trial.

2.3.3. Effect of Thermal Gradient (Printing Plate) on the Printing of Protein Gels

The geometry of the 3D printed protein gels was checked using a Leica MZ6 stereomicroscope (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 5.9 M pixel Nikon DS-Fi3

digital color camera. Images and length measurements were made with the NIS-Elements software (Nikon, Tokyo, Japan).

3. Results and Discussion

3.1. First Prototype—Drawbacks and Limitations

The development of the food 3D printer described here was carried out in a second phase. A first prototype was developed [27,28] based on a Prusa i3 3D printer. The printhead of this device, whose major characteristics are presented in Figure 1, enabled us to highlight the main obstacles to the printing of food gels (Table 2). Most commercial 3D printer printheads use stepper motors to extrude the filament. This technique can be adapted and a syringe pump made by replacing the filament drive system with a reservoir equipped with a piston or a worm. In previous work [27], the authors developed a printhead based on this syringe-pusher method, but its limitations soon became evident. Controlling the descent of the piston is delicate because it depends on the matrix used. For relatively viscous gels (gelatin 1.6 g, alginate 1.4 g, phosphate buffer saline 20 mL), the gel holding temperature and shrinkage are problematic. Despite reversal of the motor rotation to ensure the displacement of the piston, a residual flow of the matrix occurs for several minutes owing to the pressure built up inside the syringe. This makes it difficult, if not impossible, to control the geometry of the printed object.

3.2. Second Prototype

The Ghost 3D printer was modified to allow printing of protein gels by adapting the process to the matrix. Modifications were made to the control of the prototype, to its head, and to its printing plate.

3.2.1. Hardware Control

New hardware elements were integrated (Figure 2). These included a volumetric dosing system (for accuracy of deposition), a thermal regulation of this dosing system (to keep the matrix supercooled), a Peltier cooling module (to assist in gel setting), a series of sensors (control/driving), and an optical barrier (extruder purge). To avoid adding constraints or major modifications to the existing motherboard, a new electronic control board was also added. This board allows the new elements to be interfaced with the motherboard. Communication between the two boards is essential to keep the actions of each board synchronized.

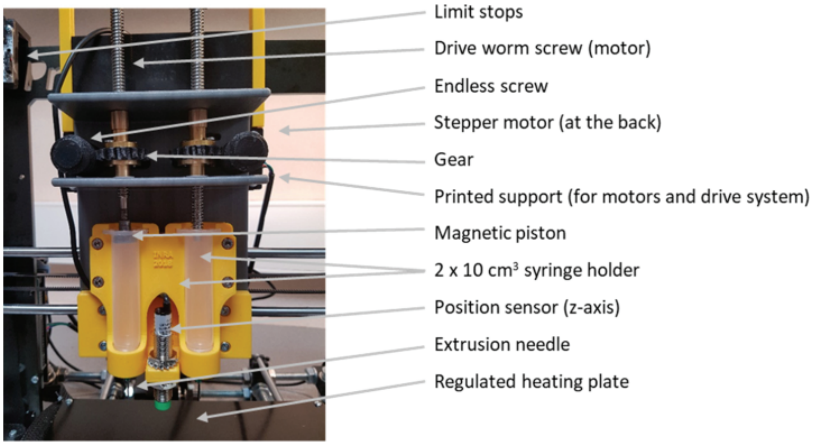


Figure 1. Printhead developed based on a Prusa i3 3D printer. The different modified elements were designed with Inventor®® and then 3D-printed.

Table 2. Main advantages and disadvantages of the first printhead prototype developed from the Prusa i3 3D printer. [1] Original parts of the 3D printer and, [2] Modified devices for the present study.

Original Parts [1]/Modified Devices [2]	Advantages	Disadvantages
Printhead [2]	Double extrusion	Displacement limited to 20 mm in z-axis
Extruder [2]	Simple design	Poor retraction
Syringe holder [2]	Adapted to the printing volume	Non-ergonomic
Printing plate [1]	No modifications	No cold control

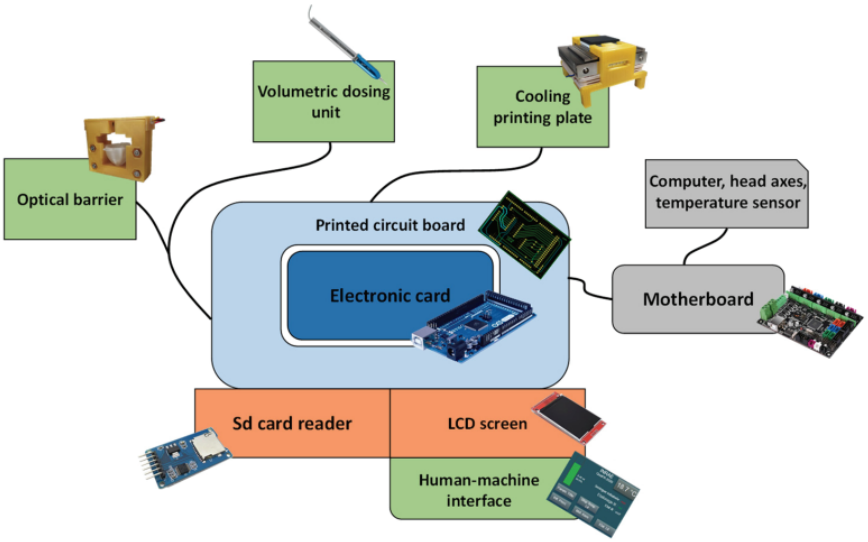


Figure 2. Schematic representation of the various electronically controlled components of the 3D food printer built. "Supplementary Materials S1" gives accurate information about the connectivity between the different added elements.

The new electronic board (Arduino Mega 2560 type microcontroller board programmed in C) was accompanied by a printed circuit board whose role was to interface the board with the rest of the elements and to house the electronic components, a touch-sensitive LCD screen for managing the "human-machine" interface, and an SD card reader for storing the printer information and operating variables. The volumetric dosing system and the cooling plate were the two main elements added. A light barrier and a "human-machine" interface created specifically for the use of this printer facilitated its use.

The communication between the original motherboard and the added electronic board was at first done in a binary way using available digital inputs and outputs. However, this binary mode of communication between the two boards soon proved insufficient. It failed to allow the transmission of more complex information for the operation of the printer such as the temperature measured by the motherboard or the position of the various axes of the printer. The use of a screen managed by the electronic board allows the use of a UART (universal asynchronous receiver-transmitter) serial link. This type of communication requires two data wires: one for sending bytes (TX) and another for receiving (RX). It is thus possible to send and receive data at the same time due to the bidirectional asynchronous link. A third wire is used to set the same electrical potential reference for both cards, which is mandatory to read the data sent or received. Communication by UART link is usually done by sending information (sentences, numbers, etc.) coded in ASCII (American Standard Code for Information Interchange) decimal format. In the case of the printer motherboard, communication with external devices took the form of G-code modified by the Marlin firmware. The G-code was supplemented by M-code, which allowed control of the machine

and its specific features. By connecting the motherboard and the electronic board via the UART-type serial link, it was possible to enable communication by exchanging G-code. However, the electronic board must be programmed to understand the ASCII coding and to interpret the G-code instructions used by the motherboard firmware.

Unlike the Arduino Mega 2560 board, the motherboard has only one UART-type serial link, linked to two different physical outputs. One is connected to the USB port, used for communication with the computer, and the other to the wired connections (RX and TX) linked to the Arduino electronic board. As the motherboard is unable to identify the source of the information received, using both outputs at the same time can lead to communication errors. To limit errors, it is essential that the motherboard, the electronic board, and the computer's USB port exchange and process information at the same speed. This speed must be set by the maximum value usable by the Arduino board, which is lower than that of other equipment; in practice, the "baud rate" is limited to 115,000 bits per second. In addition, the Repetier-Host software is unable to initiate communication with the motherboard when the transmitter wire (TX) of the Arduino board is connected to the serial link, even if this wire is inactive. As it is impossible to deactivate this wire by computer without breaking the connection between the Arduino board and the motherboard, it was necessary to set up a static relay to cut the connection between the transmission wire and the motherboard. This static relay was controlled by a digital output of the Arduino board, and only allowed connection between the transmission wire and the motherboard when information had to be sent to the motherboard.

The flow rate is a fundamental variable in obtaining a correct extrusion. In our working configuration, this flow rate was determined by both the slicer of the software and the operator. In the slicer, the flow rate was calculated according to the geometry, the line width, and the nozzle size. The flowrate was thus directly correlated with the movement of the printhead. Faster movement will extrude faster to ensure the deposition of the right amount on each circle arc. Normally, no flow adjustment is required, in particular when printing polymers to which the software used is well-suited. However, as our gels behaved differently from polymers, manual flowrate adjustments were sometimes needed to ensure cohesiveness depending on the wall thickness, layer height, infill rate, etc. This was handled by manually adjusting the extrusion multiplier setting available in the CuraEngine slicer of the Repetier-Host software.

3.2.2. Printhead Design

To overcome the uncontrolled shrinkage problems stated in the section on the first prototype, it was decided to couple the Precifluid® system to the printer (Figure 3A,B). This system has the advantage, thanks to the extremely precise control of its motor, of being able to deposit matrices of very different viscosities, ranging from water up to the gel stated above. However, as this is a commercially available device intended for stand-alone use, its control had to be completely redesigned.

To control the volumetric dosing system, the use of a new driver circuit for the Precifluid®'s stepper motor eliminates the need for a control box. To physically integrate the Precifluid® system into the printer, a device was designed and then printed in PLA (Figure 3A–C and "Supplementary Materials S2"). This allowed the Precifluid® system to be mounted and dismounted ergonomically by simply sliding it in and out of the printer for the filling and cleaning phases or even to change consumables. This last phase is very seldom optimized on lab-scale modified 3D printers. As shown in Figure 3B, this device comprised two mobile parts allowing the Precifluid® system to be held in place, and it was possible to install two volumetric dosing devices on the printhead to increase the number of ingredients used to print the food. Sufficient space was also reserved for the installation of a brass heating collar delivering a power of 6.5 $W.cm^{-2}$ (Acim Jouanin, Evreux, France), to enable the temperature of the useful part of the volumetric dosing system (10 cm^3) to be regulated. To achieve this, an aluminum sleeve was specially machined to fit both on the external face of the Precifluid® system up to the tip of the nozzle (to avoid clogging due

to gel solidification), and on the internal face of the heating collar, thus allowing optimal thermal conductivity between the two elements. The temperature regulation of the heating collar was ensured by a calculation based on a PID algorithm and controlled by a K-type thermocouple, previously calibrated using a reference platinum probe (model Testo 735, Testo, Forbach, France) placed on the external face of the aluminum sleeve. The collar was heated at least 30 min before printing to ensure temperature homogeneity.

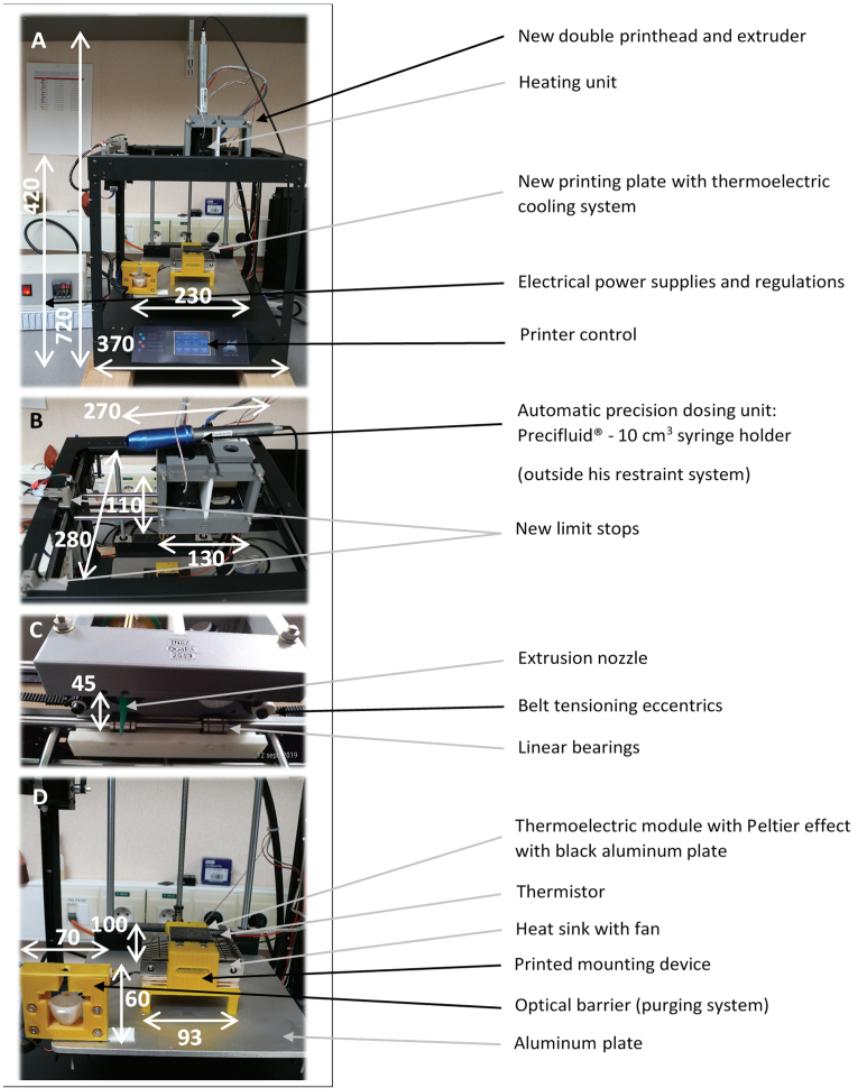


Figure 3. **(A)** General view of the lab-scale modified Ghost printer. **(B)** Top view of the printhead with the volumetric dosing system removed. **(C)** Bottom view of the printhead. **(D)** View of the new printing plate (usable area 16 cm^2). Dimensions are in mm. The drawings of the specifically-designed parts for modifying the 3D printer are available in Supplementary Materials S2.

The original volume of the printhead was increased by a factor of four compared to the original head. The limit switches were therefore relocated and mounted on new 3D printed stainless steel supports. Linear guides were also added for *x*-axis movement (Figure 3C).

Before each printing, an initialization phase of the Precifluid® system was programmed to purge the syringe and eliminate any air bubbles due to the filling of the syringe and to prevent any clogging at the nozzle outlet. For this purpose, the printhead was placed at the *x*- and *y*-axis stop. The Precifluid® system then extruded the ink through a 3D printed device equipped with an optical barrier. When the optical beam was cut by the extruded fluid (700 nm wavelength laser diode), the pusher stopped to keep the gel in a compressed state, preventing the formation of a new air bubble. The syringe was thus ready to be used for printing, and gel extrusion will be immediate. The threshold for fluid detection by the optical barrier was determined experimentally to optimize the removal of air bubbles while minimizing gel loss.

3.2.3. Printing Plate Design

The original Ghost1 printer plate was replaced by a 5 mm-thick aluminum plate. On this plate was fixed a PETG printed device (Figure 3D) designed to contain a 51.4 W Peltier effect module (Laird Technologies, Chesterfield, MO, USA) resting on a heat sink (NH-L9i cooler pack, Noctua, Vienna, Austria) to avoid overheating of the system. This heat sink was equipped with a 12 V electrically powered fan with a flow rate ranging from 1.13 to 1.61 $m^3.min^{-1}$ (Figure 3D).

The 16 cm^2 cross-sectional printing surface was composed of the Peltier effect module on which was positioned the 5 mm-thick aluminum plate of cross section 40 × 40 mm to ensure optimal thermal conduction. A 3.5 mm-deep groove was machined in the center of this plate to seal a 100 kΩ thermistor (Zhuhai Bell Technology, Zhuhai, China) as close as possible to the printing surface. The thermistor was sealed into the groove using a conductive resin loaded with 80% aluminum particles. The thermistor, whose accuracy was ±0.5 °C, was regularly calibrated at five points between 0 and 100 °C using a platinum reference probe (model Testo 735, Testo, Lenzkirch, Germany). The contact between the aluminum plate and the Peltier module was made through the yellow PETG device (Figure 3D) by means of a layer of conductive grease added between the two. The Peltier module was controlled by the Arduino board using a PID algorithm to limit any temperature disturbances induced (e.g., by the deposition of hot gel). The Peltier module's power was provided by chopping a 12 V output from an external power supply (12 V, 33 A) able to deliver a much higher power than that consumed by the Peltier module. Chopping the 12 V supply with the Arduino board from the result of the PID regulation algorithm made it possible to vary the average supply voltage of the Peltier module between 0 and 12 V, thus enabling the optimization of the cooling to reach the temperature setpoint.

Before each use, the printing plate position was calibrated at nine points. This calibration was done by requesting the Marlin firmware of the motherboard by sending it the G-Code command G29. From this command, the Marlin firmware took full charge of the calibration of the printing plate. This calibration consisted in moving the printhead's *z*-axis position sensor to nine points evenly distributed over the surface of the plate and measuring the deviation from the $z = 0$ position. Thanks to the automatic Marlin correction, this calibration made it possible to avoid horizontal defects in the plate and thus to guarantee an identical print height over its entire surface.

3.3. Characterization of the 3D Printer Components

3.3.1. Printing Plate Temperature Regulation

As the cooling plate was now equipped with a temperature sensor, it was necessary to characterize its behavior in terms of regulation speed, particularly when subjected to a deposit of hot material. The main objective was to ensure that it was efficient enough for the first layers deposited to be cooled very quickly.

First, the temperature setpoint was set at 4 °C and the temperature measured by the thermistor was recorded for 600 s, the average time for printing small model foods. Figure 4A shows a very satisfactory regulation over three repetitions of these recordings performed at a frequency of 1 Hz. All samples were distributed over a range of 1 °C,

between 3.6 °C and 4.6 °C. The average of each repetition was 4.04 ± 0.17, 4.05 ± 0.14, and 4.04 ± 0.13 °C, respectively. Figure 4B, which ranks the recorded temperature values according to their deviation from the setpoint, shows that two-thirds of them were below ±0.1 °C. Identical results were obtained for a setpoint temperature of 10 °C.

The second characterization step consisted in evaluating the temperature compensation by the PID-type control during the deposition of a hot mass. This could simulate the deposition of material during extrusion. For this purpose, a gelatin cylinder 20 mm in diameter and 10 mm high, containing 3 kg water/kg dry matter and conditioned at 30 °C, was deposited on the printing plate after it had been stabilized at 4 °C for 120 s. The temperature increase due to the deposit was very small and hardly distinguishable from the temperature variations due to the regulation (Figure 5A). To check the stability of the regulation at higher temperatures so as to approach a food-grade printing temperature, a 2 mm-thick aluminum plate, equal in size to the printing plate, and heated to 30 °C, 40 °C, and 50 °C, was positioned after 30 s (i.e., the time required for the plate temperature to be stable). This aluminum plate was chosen for this experiment because at the temperatures tested, the protein gels are in the liquid state and could therefore spread out over the printing plate. These unfavourable conditions in terms of contact surface and mass were thus chosen to check how the control operated. The results presented in Figure 5B show a very dynamic response of the regulation. A significant increase in the temperature of the plate was recorded 10 s after the deposition, and the target temperature was reached again after 40 s with an observed difference of −0.5 °C, which disappeared after a further 60 s. Under normal operating conditions, such a large mass cannot be deposited on the plate all at once, as the deposition during printing is carried out in successive layers, forming a thickness of 0.2 mm and with a maximum width corresponding to the diameter of the nozzle used.

To assess the importance of the cold regulation of the printing plate for the printing of animal protein gels, tests were carried out at 24 °C (room temperature) and 10 °C. The temperature of 10 °C was determined experimentally in preliminary tests and identified as best for printing this type of gel. Below this value, the gels solidified too rapidly and the deposition of layers took place irregularly. Above this value, the solidification was insufficient and the gel flowed without conforming to the programmed geometry. Figure 6 shows the effect of the printing plate temperature on the final shape of the printed object at room temperature. At 10 °C the shape was much more regular, whereas at 24 °C the printed shape was cylindrical only at its base and formed a dome. Note that the printed objects were deliberately 5 mm high to avoid the effect of the thermal gradient explained in Section 3.4.1.

3.3.2. Effect of Temperature on Extrusion Rate

Following the modifications made to the printer and to the Precifluid® system control, it was now possible to adjust the extrusion rate to between 0.001 and 0.610 mL.min^{-1}, for a nozzle diameter of 0.69 mm. The use of a larger nozzle diameter allowed an increase in the flow rate.

Figure 7A shows the results obtained at 60 °C, highlighting, for the three repetitions, measured deviations ranging on average from 0.01 to 0.03 mL (i.e., 1–3%), which was perfectly acceptable given the operating conditions of the extruder. We note that the values for test 1 were lower and presented a higher standard deviation, which can be explained by the presence of an outlier (17% deviation instead of 1–3%) among the 10 repetitions of the test, probably due to an air bubble in the extruder.

Figure 7B shows the effect of the flow rate on how well the predefined geometry of the object to be printed was followed, here, a gelatin gel cylinder 20 mm in diameter and 10 mm in height. This form corresponds to a portion that could serve to supplement a patient with protein deficiencies. A flow rate of 0.42 mL.min^{-1} gave a shape visually very close to the original geometry. Gelatin has a rheofluid behavior (i.e., as flow velocity and shear rate increase, its viscosity decreases). This behavior can be observed in Figure 7B: for a flow

rate of ≤ 0.42 mL.min^{-1}, the viscosity of the gelatin was too high to allow sufficient flow (the flow rate was reduced) and so conformity to the preset geometry was lost. Conversely, for a flow rate of ≥ 0.70 mL.min^{-1}, the viscosity was lower, the flow was greater, and the geometry was again lost. These findings make it possible to relate the process settings to the molecular nature of the printed matrix. Materials such as gelatin have an organized structure based on long-chain molecules that resist flow. As the shear rate increases, the molecular chains line up in parallel and tend to slide over each other. The resistance to flow and the viscosity are then lower [29].

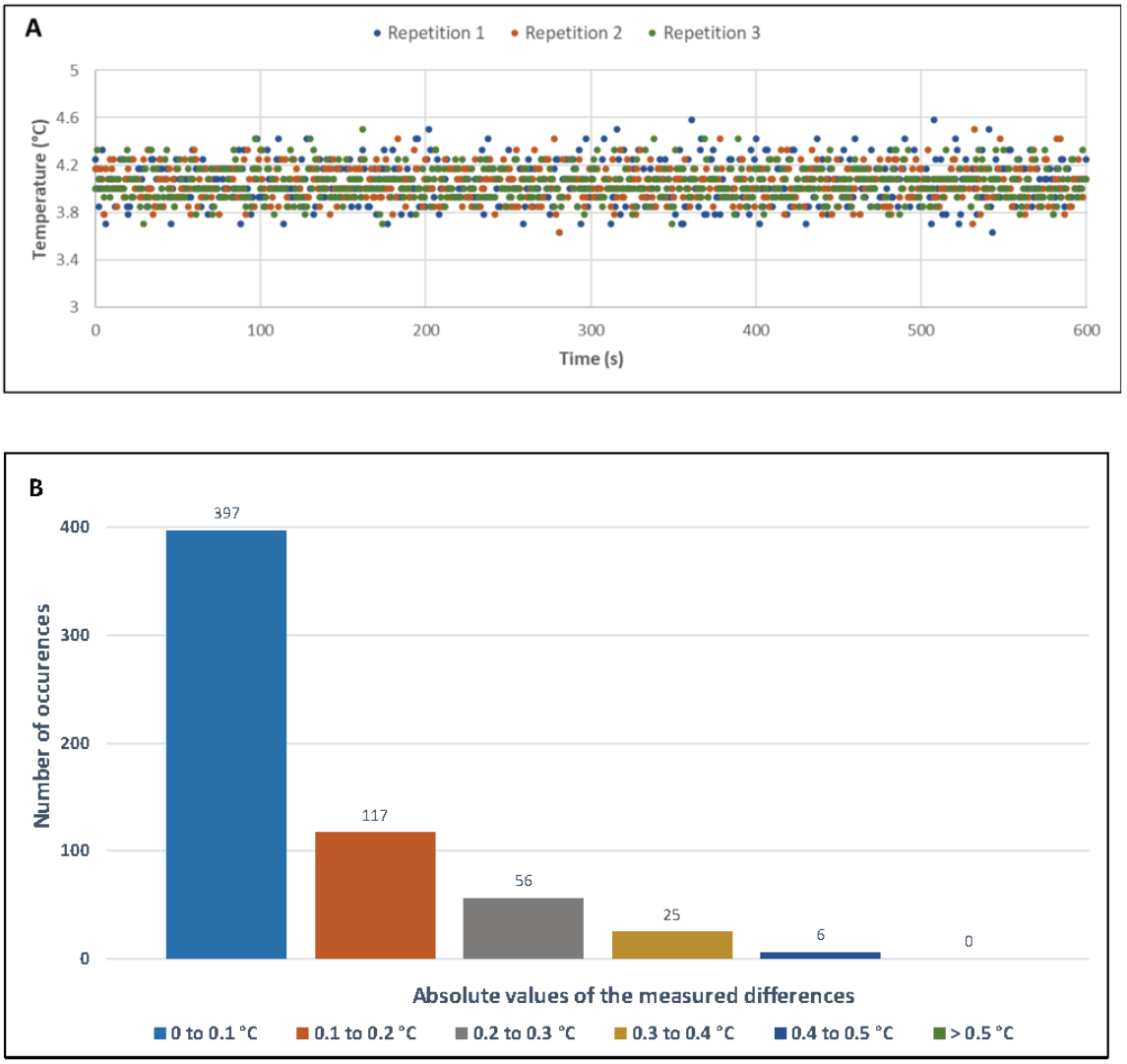


Figure 4. Graphical representation illustrating the temperature control of the printing plate. **(A)** Stability over 600 s for a setpoint temperature of 4 °C and one measurement per second. **(B)** Data distribution according to the absolute value of their deviation from the setpoint.

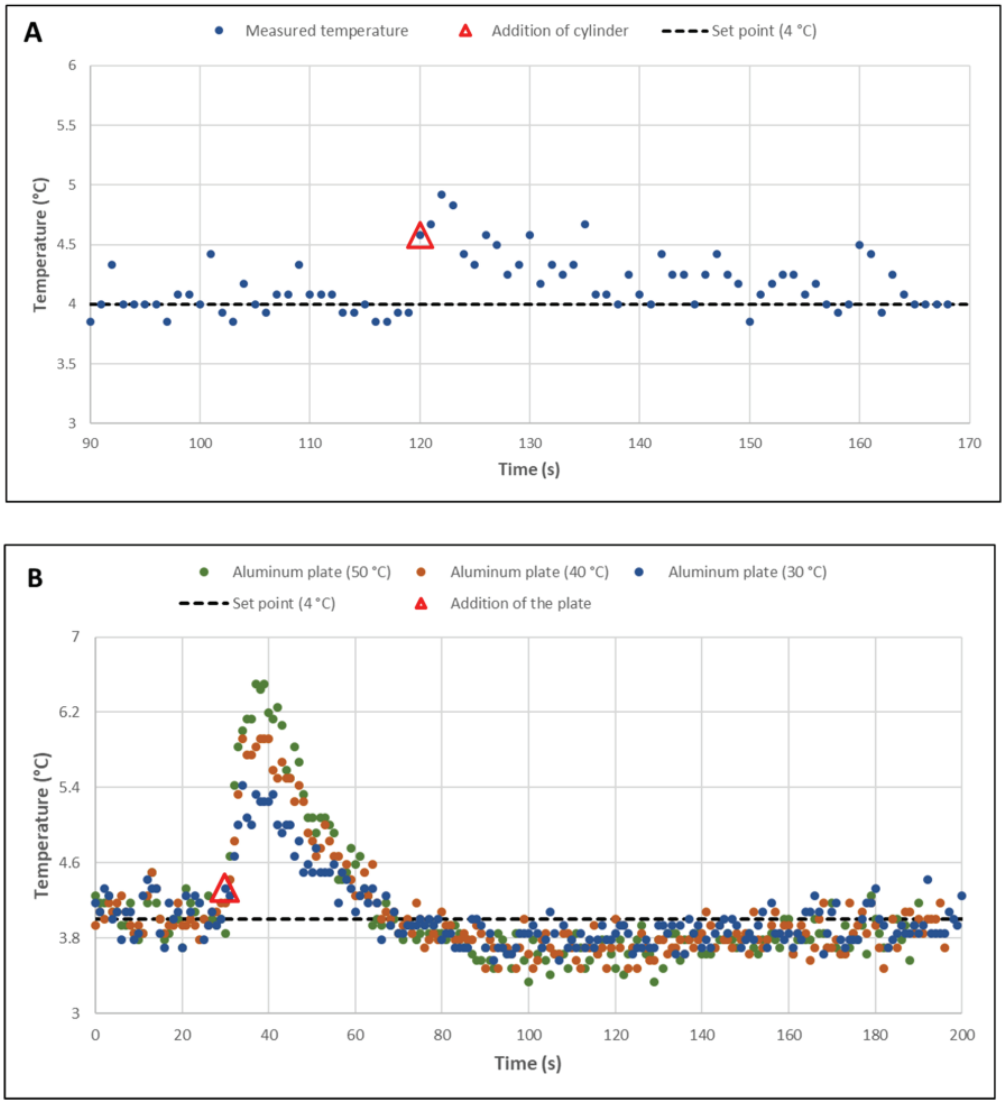


Figure 5. **(A)** Visualization of the temperature deviation from the setpoint after a hot gelatin cylinder (30 °C) 20 mm in diameter and 10 mm high was placed on the 16 cm^2 printing plate. **(B)** After placing an aluminum plate 2 mm thick and 16 cm^2 in cross section heated to 30 °C, 40 °C, and 50 °C on the printing plate.

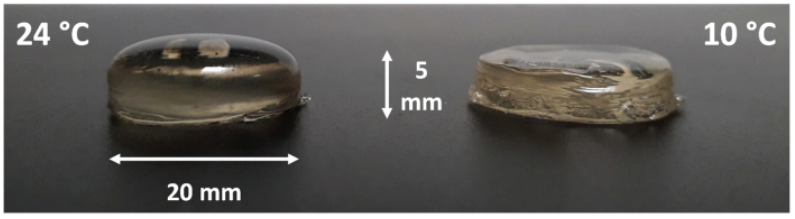


Figure 6. Effect of printing plate temperature on the cylinder geometry of protein gels.

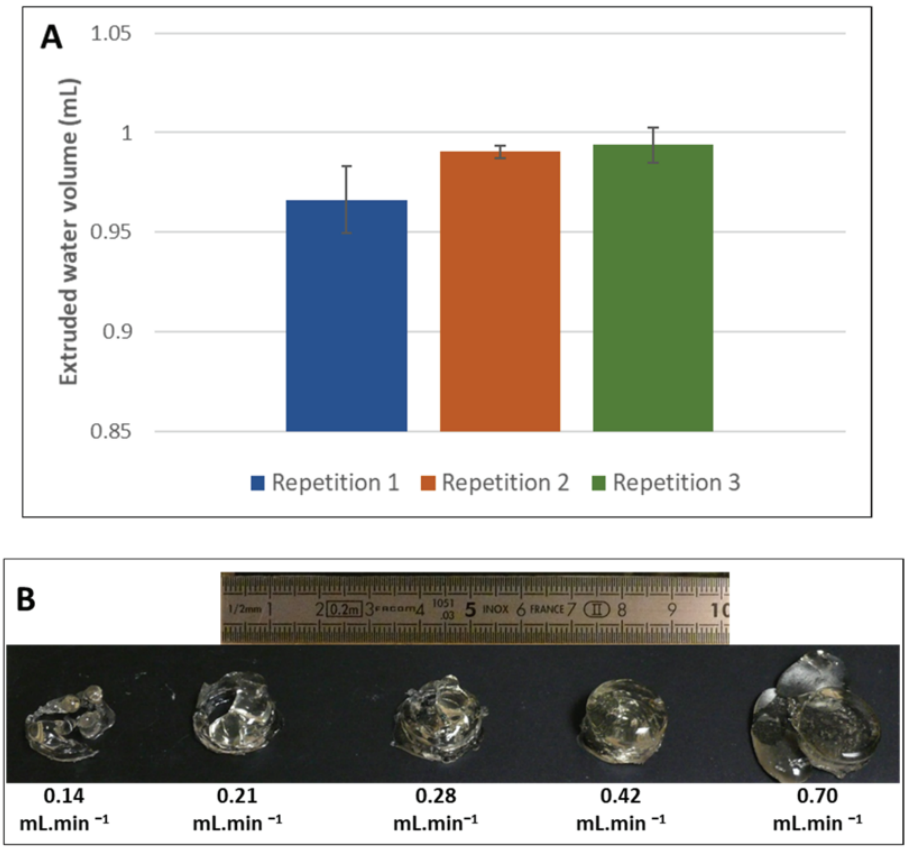


Figure 7. **(A)** Verification of the volume control delivered by the extruder at 60 °C. **(B)** Effect of flow rate on the geometry of the printed object.

3.4. Characterization of the 3D-Printed Matrices—Effect of the Process on the Geometry and Texture of Protein Gels

3.4.1. Geometry

The various experiments revealed heterogeneity in the geometry of the printed gels along the *z*-axis. This was initially attributed to a problem in settings during 3D printing, particularly for the extrusion rate. However, observations with a stereomicroscope (Figure 8A) revealed a probable link between the shape of the object and the presence of a temperature gradient within the object itself. Figure 8A shows a regular height of the gel deposits over about 4 mm, with the printing layers visible. From 4 mm onward, a curvature can be observed that deformed the upper part of the object (dome in Figure 6), the initial cylindrical geometry being lost. This can be attributed to the printing plate cooling system, i.e., the temperature of the deposited layers was no longer cold enough beyond 4 mm for layer *n*-1 to set rapidly and so allow a satisfactory deposition of layer *n*. This problem had been envisioned during the design of the device without it being possible to predict the height of the thermal gradient. This finding further justifies a second temperature control system (currently under development) to compensate for the temperature rise within the sample, which acts as a thermal insulator with respect to the printing surface. However, Figure 8B shows that the thickness of the deposited layers was perfectly in line with the value requested in the slicer: 0.2 mm (603.93 µm measured for three layers, i.e., 201.31 µm on average per layer).

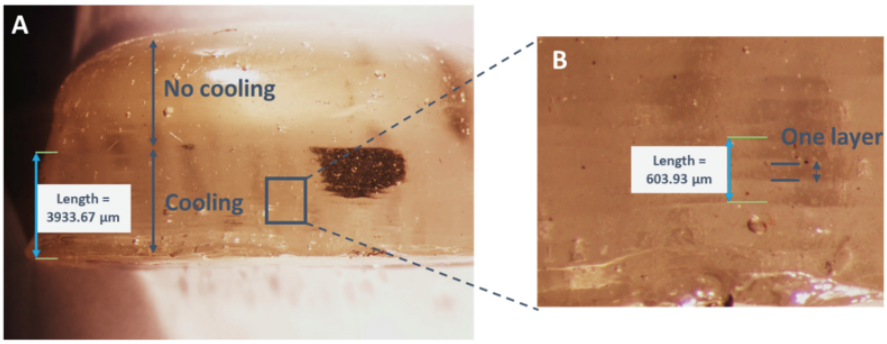


Figure 8. Effect of thermal gradient on the geometry of protein gels. **(A)** Examination of the printing defect due to lack of cooling. **(B)** Control of the thickness of the deposited layers.

Weighing was also done to check the repeatability of the gel printing. For five samples printed under the same conditions, the average mass was 1.944 ± 0.035 g, i.e., a variation of ±1.79% of the total sample mass. In addition to the good repeatability of the geometry of the printed gels, a good repeatability of their mass was also obtained, indicating good repeatability in terms of filling the printed gel. These measurements confirm that the purge programmed before the printing step is effective and necessary to limit the number of potential air bubbles.

3.4.2. Textural Measurements

Five cylinders of protein gels were printed at a flow rate of 0.42 mL.min^{-1}. The hardness of each gel was assessed by TPA measurement and compared to that of the other gels. Figure 9 shows the double compression curves obtained for the five gels tested. To facilitate visualization, each curve has been shifted from the previous one by 3 s along the *x*-axis. The mean and standard deviation of the maximum values of each peak were calculated and appear on the graph as horizontal lines, showing a very good repeatability of the measurements. Four out of five repetitions are within ±1 standard deviation (sd) and all repetitions are within ±2 sd.

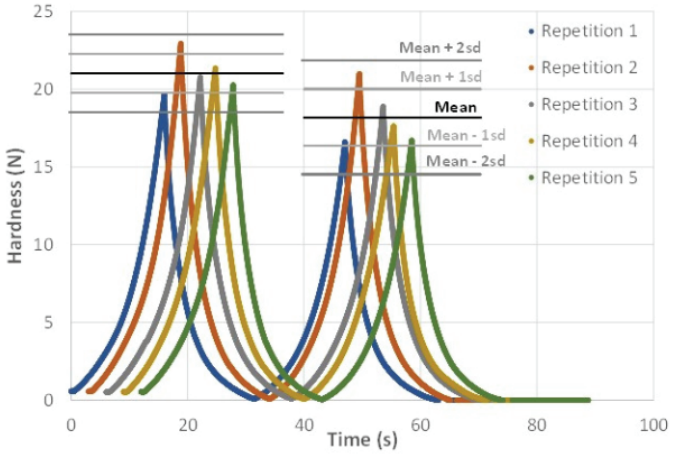


Figure 9. Hardness measurements of printed protein gels using the TPA test. The horizontal line represents the mean (in black) of the maximum forces for the five samples, and for the two successive compressions. The standard deviations around this mean are represented by the shaded horizontal lines.

4. Conclusions and Perspectives

This study shows that it is possible to modify a commercial FDM 3D printer to finely control the printing variables of a protein gel and ensure the printing of a homogeneous gel. The impact of these modifications on the printing of the protein gels was evaluated after significantly modifying the main components of the printer and its control. It was found that the modifications to the device resulted in gels of repeatable size, layer thickness, and hardness. The adjustment of the flow rate, and therefore the shear rate, and the control of the plate temperature during the printing phase, which are essential to ensure that the geometry of the printed food is maintained, were fully controlled. Although maintaining the printing plate temperature at 10 °C was effective in guaranteeing the mass setting of the gels and made it possible to control the texture of the matrix without having to use texturizing additives, the presence of a temperature gradient over the first few millimeters of the gel height still requires the development of a second cooling device.

The present study can serve as a starting point for the development of foods adapted for older people and more broadly for people with chewing deficiencies. As the older population, often affected by sarcopenia, is expected to increase considerably in the coming decades, alternatives to current protein foods, which are often difficult to chew, are needed. Future studies will exploit the benefits of controlling the printing variables described in this study, by combining them with a natural biochemical reaction to improve food texture. The synergy of these two approaches should enable marked progress in controlling the texture of foods designed for people with chewing deficiencies.

Work remains to be done on the prototype described here, particularly to address health and safety aspects, both microbiological and chemical. New metal 3D printing technologies offer new design opportunities. The possibility of printing devices made of 316L stainless steel, coupled with surface treatments designed to limit the formation of microbial biofilms, makes it possible to envisage direct contact with food in compliance with regulations. Future developments will therefore need further improved control of the 3D printing process by adding an additional cooling system to counter the temperature gradient within the food, which is created as the food is printed on the plate. The design of the printhead can also be revised using metal 3D printing technologies and generative design, so that all these new functionalities, including post-processing, can be integrated into one device. Generative design is an iterative process that optimizes the geometry of an object, considering a number of constraints specific to the object itself. This process thus makes it possible to limit the quantity of material used and so lighten the object while ensuring a robust structure [30]. In the case of the development of printheads for edible inks, this method can greatly help in the arrangement of the supply systems for the various fluids necessary during the extrusion of the edible ink, during the cooling of the printed food, and even during its post-processing. The parts resulting from the generative design will have to be integrated into the global process without causing disturbances, e.g., in the temperature control. This is why studies concerning the modelling of heat and mass transfers [31] or the digitalization of phenomena with the help of a digital twin can provide real added value [32].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods11030458/s1, Supplementary Material S1A: Graphic of the Hardware Connection; Supplementary Material S1B: Graphic of the Process; Supplementary Material S2: Elements added to the original 3D printer, designed by Computer aided design (Autodesk Inventor 2019) and manufactured by 3D printing (excluding part B2 which is machined from aluminum 2017A). Dimensions are in mm.

Author Contributions: Conceptualization, S.P., P.T., and P.-S.M.; software, P.T., P.G. and S.L.; investigation, S.P. and P.-S.M.; writing—original draft, S.P., P.T., S.L. and P.-S.M.; writing—review and editing, S.P., P.T., T.A. and P.-S.M.; supervision, T.A. and P.-S.M.; project administration, P.-S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Some of the materials used in the manuscript were funded under the CPER 3DBIO. Funding number: 2020 AURA P9.

Acknowledgments: The protein gel 3D printing device presented in this article has been protected by: an INRAE invention declaration registered under the number DI-RV-21-0012 (2021); the filing of an e-Soleau envelope n° DSO2021006565 (2021). This work is part of Stéphane Portanguen's PhD thesis entitled: "Design of mixed foods with targeted functionalities by additive manufacturing (3D printing)".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Guo, C.; Min, Z.; Bhandari, B. Model building and slicing in food 3D printing processes: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1052–1069. [CrossRef] [PubMed]
2. Portanguen, S.; Tournayre, P.; Sicard, J.; Astruc, T.; Mirade, P.S. Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 188–198. [CrossRef]
3. Portanguen, S.; Tournayre, P.; Sicard, J.; Astruc, T.; Mirade, P.S. 3D food printing: Genesis, trends and prospects. In *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2022; Chapter 36; ISBN 978-0-323-91001-9.
4. Lipton, J.I. Printable food: The technology and its application in human health. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *44*, 198–201. [CrossRef]
5. Severini, C.; Derossi, A.; Ricci, I.; Caporizzi, R.; Fiore, A. Printing a blend of fruit and vegetables. new advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 89–100. [CrossRef]
6. Sun, J.; Zhou, W.; Yan, L.; Huang, D.; Lin, L.-Y. Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 1–11. [CrossRef]
7. Zhao, H.; Wang, J.; Ren, X.; Li, J.; Yang, Y.L.; Jin, X. Personalized food printing for portrait images. *Comput. Gr.* **2018**, *70*, 188–197. [CrossRef]
8. Mantihal, S.; Prakash, S.; Godoi, F.; Bhandari, B. Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modeling. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *44*, 21–29. [CrossRef]
9. Kousani, A.Z.; Adams, S.; Whyte, D.J.; Oliver, R.; Hemsley, B.; Palmer, S.; Balandin, S. 3D printing of food for people with swallowing difficulties. In Proceedings of the International Conference on Design and Technology, Geelong, Australia, 5–8 December 2016; Knowledge E: Dubai, United Arab Emirates, 2017. [CrossRef]
10. Bégin-Drolet, A.; Dussault, M.A.; Fernandez, S.A.; Larose-Dutil, J.; Leask, R.L.; Hoesli, C.A.; Ruel, J. Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. *Addit. Manuf.* **2017**, *15*, 29–39. [CrossRef]
11. Zeleny, P.; Ruzicka, V. The design of the 3D printer for use in gastronomy. *MM Sci. J.* **2017**, 1744–1747. [CrossRef]
12. Hurst, K.G.; Comi, T.J.; Bhargava, R. Model-guided design and characterization of a high-precision 3D printing process for carbohydrate glass. *Addit. Manuf.* **2018**, *22*, 38–50. [CrossRef]
13. Diañez, I.; Gallegos, C.; Brito-de la Fuente, E.; Martínez, I.; Valencia, C.; Sánchez, M.C.; Diaz, M.J.; Franco, J.M. 3D printing in situ gelification of κ-carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 321–330. [CrossRef]
14. Vancauwenberghe, V.; Verboven, P.; Lammertyn, J.; Nicolaï, B. Development of a coaxial extrusion deposition for 3D printing of customizable pectin-based food simulant. *J. Food Eng.* **2018**, *225*, 42–52. [CrossRef]
15. In, J.; Jeong, H.; Song, S.; Min, S.C. Determination of material requirements for 3D gel food printing using a fused deposition modeling 3D printer. *Foods* **2021**, *10*, 2272. [CrossRef] [PubMed]
16. Liu, Z.; Zhang, M.; Yang, C.H. Dual extrusion 3D printing of mashed potatoes/strawberry juice gel. *LWT* **2018**, *96*, 589–596. [CrossRef]
17. Kim, N.P.; Eo, J.S.; Cho, D. optimization of piston type extrusion (PTE) techniques for 3D printed food. *J. Food Eng.* **2018**, *235*, 41–49. [CrossRef]
18. Severini, C.; Derossi, A.; Azzollini, D. Variables affecting the printability of foods: Preliminary tests on cereal-based products. *Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *38*, 281–291. [CrossRef]
19. Yang, F.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Liu, Y. Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *LWT* **2018**, *87*, 67–76. [CrossRef]
20. Wang, L.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Yang, C. Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 101–108. [CrossRef]
21. Fretheim, K.; Egelandsdal, B.; Harbitz, O. Slow lowering of pH induces gel formation of myosin. *Food Chem.* **1985**, *18*, 169–178. [CrossRef]
22. Dong, X.; Pan, Y.; Zhao, W.; Huang, Y.; Qu, W.; Pan, J.; Qi, H.; Prakash, S. Impact of microbial transglutaminase on 3D printing quality of *Scomberomorus niphonius* surimi. *LWT* **2020**, *124*, 109123. [CrossRef]
23. Yang, G.; Tao, Y.; Wang, P.; Xu, X.; Zhu, X. Optimizing 3D printing of chicken meat by response surface methodology and genetic algorithm: Feasibility study of 3D printed chicken product. *LWT* **2021**, *154*, 112693. [CrossRef]

24. Dick, A.; Bhandari, B.; Prakash, S. 3D printing of meat. *Meat Sci.* **2019**, *153*, 35–44. [CrossRef]
25. Dick, A.; Bhandari, B.; Prakash, S. Post-processing feasibility of composite-layer 3D printed beef. *Meat Sci.* **2019**, *153*, 9–18. [CrossRef] [PubMed]
26. Schreuders, F.K.G.; Schlangen, M.; Kyriakopoulou, K.; Boom, R.M.; van der Goot, A.J. Texture methods for evaluating meat and meat analogue structures: A review. *Food Control.* **2021**, *157*, 108103. [CrossRef]
27. Tournayre, P.; Portanguen, S.; Sicard, J.; Mirade, P.S. Study and realization of a 3D dual print head for meat-based food products. In Proceedings of the 32nd EFFoST International Conference, Nantes, France, 6–8 November 2018; Available online: https://hal.inrae.fr/hal-02785141/document (accessed on 13 December 2021).
28. Portanguen, S.; Tournayre, P.; Sicard, J.; Astruc, T.; Mirade, P.S. Conception d'aliments à fonctionnalités ciblées par impression 3D. In Proceedings of the XVIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Nantes, France, 5–14 July 2020; Available online: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02330240/document (accessed on 13 December 2021).
29. Bousquet, C. Rôle des Pluronics sur les Propriétés Rhéologiques, de Séchage et de Fracturation des gels Aspirables de Décontamination. Chimie Théorique, Physique et Analytique. Ph.D. Thesis, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 2007. Available online: https://www.osti.gov/etdeweb/servlets/purl/21036320 (accessed on 13 December 2021).
30. Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Gomes, S.; Bernard, A. Bio-inspired generative design for support structure generation and optimization in additive manufacturing (Am). *CIRP Ann.* **2020**, *69*, 117–120. [CrossRef]
31. Harkouss, R.; Chevarin, C.; Daudin, J.-D.; Sicard, J.; Mirade, P.-S. Development of a multi-physical finite element-based model that predicts water and salt transfers, proteolysis and water activity during the salting and post-salting stages of the dry-cured ham process. *J. Food Eng.* **2018**, *218*, 69–79. [CrossRef]
32. Stavropoulos, P.; Papacharalampopoulos, A.; Michail, C.K.; Chryssolouris, G. Robust Additive Manufacturing Performance through a Control Oriented Digital Twin. *Metals* **2021**, *11*, 708. [CrossRef]

Annexe V 6.

Chapitre « Portanguen et al. (2022) Elsevier Inc ».

Chapter 36

3D food printing: Genesis, trends and prospects

Stèphane Portanguen, Pascal Tournayre, Jason Sicard, Thierry Astruc, and Pierre-Sylvain Mirade
INRAE, Animal Product Quality Unit (QuaPA), Saint-Gene's-Champanelle, France

I Introduction

The first additive manufacturing technologies were devised several decades ago, but their development is relatively recent (Fig. 1). Applications are currently flourishing in a wide variety of industries. Three-dimensional food printing (3DFP) is probably the most recent application; the first tests date from 2007 to 2008 with an article published in Wired Magazine (Irwin, 2007), dealing with the manufacture of caramel structures, and with a patent (Lai and Cheng, 2008) proposing a new three-dimensional manufacturing method for food. Between 2010 and 2012, many articles began addressing the potential of this type of manufacturing, mainly focusing on trends and possible outlets. The first research articles published in scientific journals appeared in 2010, such as the work of Hao et al. (2010) on chocolate. The first review articles were not to appear until 2–5 years later (Lipton et al., 2015; Sun et al., 2015a, c, b; Wegrzyn et al., 2012), when the amount of available data on the subject began reaching useful levels. Since these initial reports, the scientific literature has grown exponentially (Fig. 1), and many research teams around the world are now working on the subject, taking an interest in (i) the development of materials, and more specifically the modification of 3D printers to adapt them to food constraints, and (ii) the formulation of foods or the rheological properties of these foods and their printability. Godoi et al. (2016) defines printability as the set of properties that lend products sufficient dimensional stability to support their own weight.

Many foods can be printed, but as we will see in this chapter, the difficulties met in 3DFP vary greatly depending on the macromolecule composition of the product, and on the process used. In some cases, the use of texturizing additives is therefore still mandatory at present. The "texture" aspect is also one of the main obstacles today for this type of technology. In the case of 3DFP, it must be understood that the food and/or the ingredients are first unstructured in a semi-solid state before they are extruded through a nozzle by the action of a pressure generator (piston or worm) and printed on a plate. This deposit then takes on a geometry defined beforehand in a digital file, which will later enable macroscopic restructuring of the food (Lipton, 2017; Mantihal et al., 2019). However, at the microscopic scale, the macromolecules of interest will undergo a certain number of constraints: mechanical, such as shearing (Dankar et al., 2018a; Dick et al., 2019a), and even chemical (oxidations, endogenous reactions, etc.), which will generate a texture of the printed food markedly different from that of the initial matrix. In many cases, this does not change the way the food is usually eaten, e.g., for grain products. The texture of a printed cookie is in no way different from that of a conventionally produced cookie (Kim et al., 2019). On the other hand, for more sophisticated foods, in particular, those made of animal proteins and lipids, the texture expected by the consumer may be very different from that obtained. Some authors believe that an excessive transformation of the texture of foods (especially fruits) is detrimental to consumer health and that the "matrix effect" is essential in nutritional balance, and in the prevention of certain health disorder (Fardet et al., 2019). Many authors argue that the main advantage of 3DFP lies not in the mass production of food, but in the personalization, or targeting, of the food.

The first part of this chapter reviews the main food families that have already been printed, namely foods of plant or animal origin or combining the two. The second section describes the main advances concerning the major strength of 3DFP, namely personalized nutrition. The main questions raised by 3DFP relating to the sustainability of this manufacturing process, and the naturalness and consumer acceptability of printed products are addressed in the third section. The last part of this chapter presents the emerging trends in 3DFP and sets out perspectives for the next two decades. Fig. 2 provides a schematic description of the various points that will be addressed throughout this chapter.

Future Foods. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00008-6
Copyright © 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

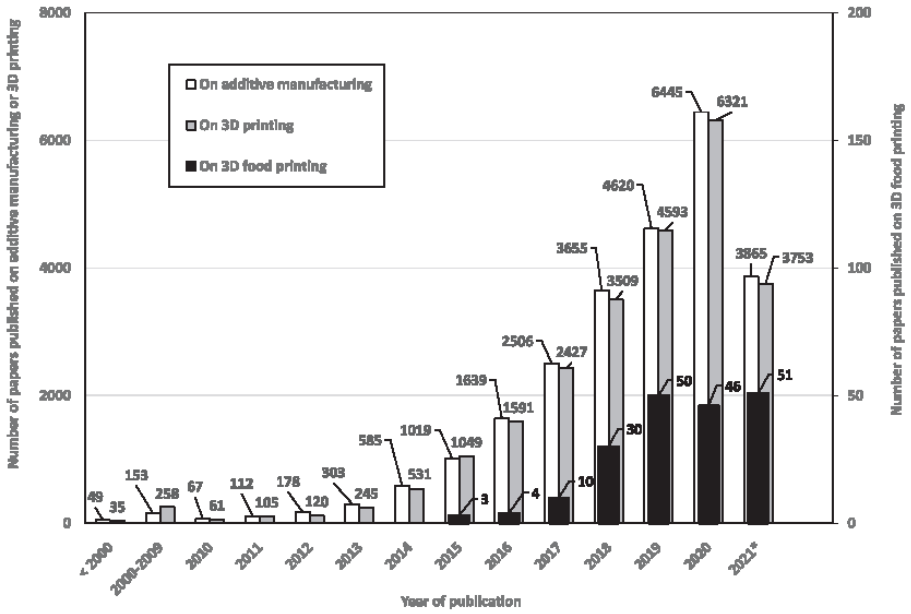


FIG. 1 Time-course evolution of the number of papers (including review articles, research articles, book chapters, short communications, conference abstracts…) published since the emergence of 3D printing technology. The figures were obtained from requests performed on the ScienceDirect platform using the following keywords: "additive manufacturing" or "3D printing" or "3D food printing" (*:The figures for the year 2021 are only partial as the request was made in mid-April).

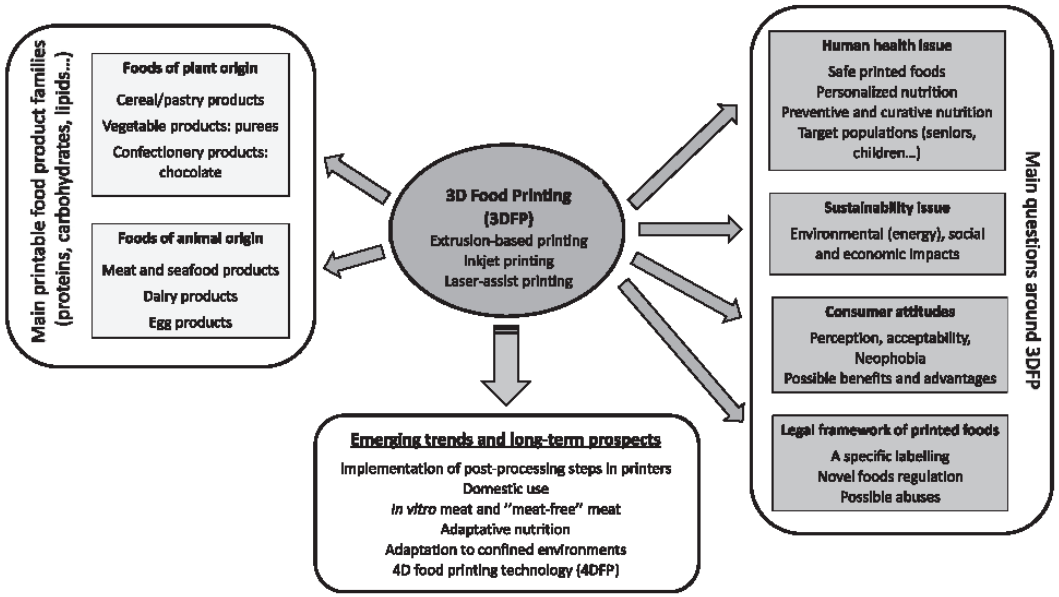


FIG. 2 Schematic description of the different points that will be addressed in this chapter on 3D food printing (3DFP).

2 Printable food product families

More and more foods can be 3D-printed, or at least more and more work is being done to investigate the printability of these foods. This nuance is important because the result is conditioned by whether or not additives are used, which may go against the current desires of consumers looking for healthier and more natural foods. Combining chemical transformation using additives with the physical transformation of food during the manufacturing process may be a step too far. This section gives information on the main categories of printable foods of plant and animal origin.

2.1 Foods of plant origin

This category can be divided into two parts: cereal or vegetable products and confectionery products. The latter were also the first to be studied, which is explained by the very principle of 3DFP, namely deconstructing before restructuring. This last step being the most delicate, it is obvious why products with a low melting point, crystallizing rapidly at a low temperature or rich in starch tend to have high printability and a texture close to what the consumer is used to.

It is still sometimes necessary to modify the formulation of certain products upstream, like the work on chocolate by Mantihal et al. (2019) and Mantihal et al. (2017). Although chocolate has the advantage of being extrudable at low temperature (32°C, for the product to melt between 28°C and 30°C), and solidify at room temperature (20–25°C), these authors used additives to improve the printability of this material, namely 5% of magnesium stearate, or 3% of plant sterol, to facilitate lubrication and improve flow efficiency during deposition. At this stage, we can reasonably wonder whether 3DFP is useful if we have to make the food formulation more complex to be able to print it, without even managing to obtain the same properties as the original food. As shown by Mantihal et al. (2019), pattern (star or honeycomb are the most effective forms) and filling rate strongly condition the mechanical resistance of the printed structure, but it is still more fragile (up to over 20%) than chocolate conventionally poured in layers with no space. For confectionery products such as chocolate, changing the internal and/or external geometry may add value to the product, particularly in terms of mouthfeel. However, might it not be wiser to achieve this result, working only on the process, without having to change the food formulation? The study of Karyappa and Hashimoto (2019) took a different approach. Instead of working directly from raw chocolate, a mixture of spread, cocoa powder and chocolate syrup was used. This formulation, certainly far from being a conventional chocolate, has the merit of not using any additives—except for those contained in the original raw materials—and of being carried out at room temperature. It is the proportion of cocoa powder (5%–25%, by mass) that makes it possible to fix the rheological properties (elastic stress and storage modulus G') that is, according to Karyappa and Hashimoto (2019), the first variable to optimize for printing. The second variable is at the level of the product distribution system, i.e., the pressure generator, syringe, and nozzle. It is there that the mass flow rate—the ratio of the pressure drop in the syringe to the diameter of the nozzle—will be determined, and where the matrix will undergo the highest shear stress (nozzle). Finally, the third variable is the moving velocity of the print head, which will determine the amount of material deposited per unit length, and the vertical pitch between two adjacent layers.

The second category of foods of plant origin, often very carefully studied in 3D printing, mainly comprises pastry products (dough, cookies, etc.) and vegetable purees, especially potato-based, i.e., rich in starch. Like Karyappa and Hashimoto (2019) for chocolate, Liu et al. (2019a) have underlined the importance of formulation and process parameters on the printing properties of these types of products. After numerous trials, the authors concluded that a four-component formulation composed of wheat flour, freeze-dried mango powder, olive oil, and water (in respective mass proportions of 57.5:2.5:3.5:30), and used them under the following operating conditions: Pressure at 600 kPa, speed 6 mm/s, nozzle diameter 0.58 mm and filling rate 50%, enabled the best printing quality to be obtained. However, counterintuitively, increasing the mass percentages of the different ingredients negatively affected the material's extrusion ability. This was also shown by Liu et al. (2018a) for starch. In printing mashed potato, an added amount of starch up to 2% promoted printability, by increasing the material elasticity, but at 4%, suitability for extrusion became mediocre, owing to a too-high viscosity. Similar work on formulation development was carried out on bread dough (Yang et al., 2018). However, each time, the presence of a lubricating ingredient (oil, butter, etc.) seemed necessary to obtain a correct extrusion. In the study of Yang et al. (2018), the same rupture of continuity during extrusion was observed as soon as the mass concentrations of sucrose, flour and butter reached a threshold.

At this stage, we need to look at the use of texturizing additives, and more specifically hydrocolloids, which are widely used when printing products of either animal or plant origin, although the latter are richer in carbohydrates and their printability is better. Their presence greatly facilitates the deposition and cohesion of the layers and has a positive influence on dimensional stability (Kim et al., 2019). Their use thus constitutes a simple, inexpensive alternative that helps to overcome texture defects. As underlined by Godoi et al. (2019), a controlled formulation of hydrocolloids can mimic the mouthfeel of

existing foods, besides the taste, by adding flavoring agents. For example, 4% xanthan gum gives the same mouthfeel as mashed potatoes, and 1% gelatin plus 8% xanthan gum results in a tomato-like texture. In our opinion, although the presence of hydrocolloids in food is not a problem insofar as they are authorized for human consumption, such additives are nevertheless emblematic of extreme processing of food products, and so in the long term, could lead to their rejection by consumers—not to mention that from a technical and scientific point of view, they are an easy way out that obviates seeking healthier solutions, particularly those based on perfect control of all stages of the printing process.

2.2 Foods of animal origin

Products of animal origin have not been studied as much for 3DFP applications as those of plant origin, most likely because printability is difficult owing to the absence of carbohydrates. Nevertheless, among the existing studies, three main families of animal products have been especially studied: meat and seafood, cheese-type dairy products and egg products, in descending order of number of articles published. This section reviews the barriers and limitations encountered in printing this type of food.

Meat products

Among animal products, meat products are probably those that present the most difficulties during the printing phase. This doubtlessly explains their smaller share of the scientific literature compared to plant products, and why no structured meat product can yet be printed, to our knowledge, without using additives. This drawback certainly limits the development of 3D-printed meat products, because it is difficult to explain and justify why a consumer should eat food processed in its structure, its form, and its composition, and rich in additives. Evans et al. (2010) demonstrated that physical/mechanical transformations were better accepted than chemical transformations, but if the two are combined, it is very likely that the food will be directly viewed as an ultra-processed product, and so thought to be bad for health or for the environment.

At present, the only animal product that can claim to be 3D printed, without the use of additives, is surimi. This food, which is already processed upstream, contains about 7% carbohydrates in the form of starch, which favors its printability. However, a study showed that with equivalent print parameters, the results were much better after the addition of 1.5% sodium chloride (NaCl). This can be explained by the fact that NaCl modifies the ionic strength of the medium and so promotes the crosslinking of myofibrillar proteins with free amino acids (Wang et al., 2018a, b).

A recent example of 3D meat printing was reported by Dick et al. (2019b). In their study, the authors printed food from two distinct ingredients: lean beef containing less than 5% fat and added fat to reconstitute and print a food resembling a ground beef patty. The destructuring of the meat was done mechanically until a printable paste similar to an emulsion was obtained. This emulsion finally contained 85% meat, 14% water, 0.5% NaCl and 0.5% guar gum. As in Wang et al. (2018b), the NaCl, by causing extraction of myofibrillar proteins, stabilized the dough through the bond formation. The results showed that printing was possible, together with thermal post-treatment.

Whether for seafood or meat products, several additives are used not only to facilitate the printing of the food but also to ensure that the food retains its geometric shape at the end of the printing process or after the cooking stage. Among the most commonly used additives are transglutaminase (Lipton et al., 2015) and various gelling agents of plant origin, or algal derivatives, such as guar gum, xanthan gum, agar, alginate, glycerol, and lecithin. We note that these various additives, except for transglutaminase, can also be used for printing non-meat foods. However, some legislations do not authorize the use of all these additives, notably transglutaminase in France. The article by Zhao et al. (2020) gives a fairly exhaustive review of the properties of the main food additives used in 3DFP. In concrete terms, the use of these additives is today essential for most foodstuffs containing no, or too few, carbohydrates. However, alternative technological solutions that can improve the texture of printed meat foods can be implemented without the use of these additives.

The simplest solution would be to combine animal and plant products to gain from the natural presence of carbohydrates in plants. This would also make it possible to vary protein sources, which can be of interest from a nutritional point of view. To our knowledge, no studies on the printability of such mixed products have been published. The articles by Perez et al. (2019) and Portanguen et al. (2019), although they explore the printability properties of the main macromolecules such as proteins, carbohydrates, and lipids, do not deal with this aspect. Severini et al. (2018a) worked on the development of a mixed food based on animal proteins from insects (yellow mealworms). However, in their study, the insect larvae, previously dried and then powdered, were incorporated as flour, which does not truly qualify as a traditional animal product.

A second solution would be to exploit the gelling potential of myofibrillar proteins. This gelling power is not sufficient to print food from muscle, but extracting actin or myosin from lower muscle or animal by-products holds promise, provided that the extraction can be controlled. Solubilization by adding NaCl is not enough to structure a food—especially as it is

important to limit salt consumption in humans for the prevention of cardiovascular diseases -, and extracting these proteins is long and tedious and requires several ionic solvents. Yields are also often very low and therefore incompatible with large-scale use in the food sector. Also, the application of thermal gradients necessary for gelling can be harmful to the organoleptic or nutritional properties of the final product.

The third and perhaps most promising solution consists in using the ability of the free amino acid residues in proteins to bind covalently to reducing sugars in the early stages of the Maillard reactions. However, this still requires much development. The complexity of this technique lies in the large number of reaction variables to be controlled: type and concentration of the sugar, reaction time, temperature, pH, water activity, etc., both to produce the desired effects, and to stop the reaction before compounds of the advanced glycation end-product (AGE) type, harmful to humans, are generated (Nooshkam et al., 2020; Stevenson et al., 2020).

Dairy products

In explaining the scarcity of studies on the 3D printing of dairy products, the question arises of whether designing such foods using this process is truly useful. The gelling properties of dairy products (yogurts, cheeses) have been well known and mastered for centuries. Their texture, which is usually soft, makes them easy to consume by everyone, so what would be the benefit of printing them in 3D. New shapes? These are easy to obtain by simple molding. However, using this technology again offers a way to personalize nutrition. The possibility of such an application was advanced in the work of Liu et al. (2018a, b) for designing foods enriched with whey proteins, to make gainful use of co-products, even if this was not explicitly claimed by the authors. From a more technical point of view, dairy products do have certain predispositions for 3D printing. The work of Le Tohic et al. (2018) showed that if the printing settings were controlled (12 mL/min at 75°C for processed cheese), then the shear rate during the extrusion phase made it possible to homogenize the size and distribution of the fat globules, which also act as a lubricant. This was confirmed by Lille et al. (2018) and Liu et al. (2019c), who were able to show that the printability of a formulation concentrated in milk proteins (up to 60%) was impossible if the milk in question was skimmed (0.4% fat). By contrast, the printing of a partially skimmed formulation (9% MG) was excellent, both in terms of accuracy and shape retention. By studying the structure of milk protein gels, Liu et al. (2019c) showed that increasing the protein content in the medium allowed the transition from an entangled state to a 3D array with better printability characteristics. Very recent work (Lee et al., 2020) has addressed the issue of 3D printing of foods containing temperature-sensitive nutrients. Using milk powder, whose concentration could be as high as 75% by mass, these authors were able to print 3D structures made up of several materials—external structure based on milk and filling based on different syrups: chocolate, blueberry, cream, or maple—without the use of additives. The technology used was cold extrusion by direct ink writing (DIW). Concretely, to ensure correct printability, the formulation must meet two essential characteristics, again according to Lee et al. (2020): (i) it must exhibit shear-thinning behavior, and (ii) it must keep its shape on deposition. To achieve this, the food-grade ink used must have a high yield strength and a high storage modulus G'. For example, an ink consisting of 10% milk powder (by mass) is not suitable for the printing process. The optimum milk powder content determined by the study was 70%, leading to a less viscous ink and requiring a lower extrusion pressure than the 75% formulation (Lee et al., 2020).

It thus turns out that most of the studies cited in this section have not worked on the crude raw material but concentrated formulations, highlighting limits to the use of dairy products, even though encouraging results have now been reported by Lee et al. (2020).

Egg products

Like dairy products, 3D printing of egg products has received relatively little attention. The work of Anukiruthika et al. (2020) focuses on a mixed product consisting of egg yolk or egg white and rice flour. As in most cases, the objective of this study was to determine the optimal printing parameters. The study showed that egg yolk and egg white were not printable in their original form and that adding rice flour (i.e., starch) is essential, which greatly improves the stability and strength of the printed matrix both texturally and rheologically. It also appears that egg yolk is better suited to printing than egg white. This property is thought to be due to an increased ability of egg yolk proteins to interact with starch. It is also worth noting that the yolk contains more lipids than the white, and that these act as plasticizers and lubricants. This tendency to make the formulation more complex to obtain good printing performance is also central to the work of Liu et al. (2019b). This time, egg white proteins were combined with gelatin, corn starch and sucrose to improve rheological properties during printing. The geometry and stability of the structure were ensured by precise printer settings: nozzle diameter 1 mm, displacement speed 70 $mm.s^{-1}$ and extrusion rate 0.004 cm^3s^{-1}.

Egg products and dairy products are thus both difficult to use in their native forms. The prevalent trend in laboratories is therefore to work on the formulation to improve printability. However, as already mentioned in this chapter, the current consumer trend towards more naturalness, and therefore the banning of additives, means that the control and adaptation of the process to the product are now fundamental, as shown by Xu et al. (2020). In this study, by investigating different heat treatments applied to egg yolk, the authors showed for the first time that heating at 76°C for 8 and 10 min, or 80°C for 6 min, allowed not only easy extrusion but also good adhesion between the layers, thus ensuring maintenance of shape after printing. This work is one of the first published studies to put process adaptation at the heart of 3DFP.

Given all the difficulties described above, printing structured food without using chemical additives is a challenge that 3DFP will have to face in the coming years. This will require a full understanding of the interactions that occur between edible inks to be printed and the printing systems used to subsequently control the printing process.

3 Main utility of 3DFP: Personalized nutrition

Mass production of foodstuffs using 3D printing is not the go-to solution, as this technology was not originally designed for mass production, but rather for prototyping and custom design. To date, 3D printers are failing to keep up with industrial production rates, partly because printing times are still too long. Even if in certain sectors of activity (mechanical engineering), mass production is now being envisaged thanks to technological advances, the food sector still has far to go to reach this stage of development. In addition, it is not certain that consumers are ready to consume printed food every day (cf. Section 4). On the other hand, the personalization of food through 3D printing, a concept formulated by Wegrzyn et al. (2012), is the most likely way that this technology can benefit humans. In our opinion, this concept has three distinct but complementary aspects: (i) preventive nutrition, (ii) curative nutrition, and (iii) adaptive nutrition, in that order of importance.

Preventive nutrition is the most important aspect as several categories of people can be concerned. Although most people in industrialized countries have access to a balanced diet, certain categories may develop deficiencies, either through choice (food preferences), or low resources or because of allergy or intolerance problems. Children are directly concerned because they are often reluctant to follow nutritional recommendations, particularly regular consumption of fruit and vegetables. This is the focus of the work of Derossi et al. (2018), who have developed a printable fruit-based formulation intended for children aged 3–10, which is palatable, to provide them with 5%–10% of their daily energy, calcium, iron and vitamin D intake. Pregnant women (Dankar et al., 2018b) are also a prime target, owing to a highly modified diet during pregnancy, with several foods that are discommended or prohibited. This life stage is most often accompanied by the complementary intake of several nutrients that could be incorporated into a 3D-printed food. This is what the company "Get Nourished" offers everyone via a questionnaire, from which an algorithm makes a personalized formulation based on seven ingredients (vitamins, minerals, etc.) integrated into a vegan hydrocolloid gel-type food to ensure optimal bioavailability. According to Augusto (2020), innovative processes such as 3D printing could also improve the well-being of people with gastroesophageal reflux—a widespread ailment—in particular by improving the rheology of food. In the context of preventive nutrition, we also need to talk about people who engage in intense physical activity. In this case, 3D printing can help, through intelligent food formulation, to ensure the protein and calorie intake appropriate for high-level sportsmen and women, for example.

Another population group allies preventive and curative nutrition: the elderly, whose numbers will continue to grow in the coming decades. The World Health Organization predicts massive aging of the world's population by 2050, with 30% of people over 60 years old. This aging will be accompanied by oral disorders, with approximately 20%–30% of the population expected to be edentulous in the 2030s (WHO, 2016). Elderly people with dental impairments consume foods that are less difficult to chew, but also often nutritionally poorer, even though they have an increased need for very high-quality protein (Buffière et al., 2017). This is generally the case for meat, which is often eliminated from the diet because it is considered difficult to chew, leading to protein deficiency that over the years can have serious consequences: undernutrition, sarcopenia, and loss of mobility and autonomy. The work of Farouk et al. (2018) shows that animal proteins can be used in a form such that it is possible to increase protein intake for people with chewing difficulties. The incorporation of red meat powder (freeze-dried meat) in various foods (bread, spaghetti, yogurt, ice cream, and chocolate) has made it possible to increase protein levels by up to 28% while ensuring good sensory acceptability of these products among consumers. This study perfectly illustrates the product innovations that can be developed by applying new processes such as 3DFP, which allows both the shape and texture of food to be adapted. Where the authors have used *longissimus dorsi*, it would be quite conceivable to use meat other than prime cuts, such as offal or animal co-products, but whose nutritional quality would be satisfactory (cf. Section 4). 3DFP has the advantage of being able to texture, notably by adapting the filling rate, a food rich in proteins, and so to facilitate the formation of the alimentary bolus and swallowing without the risk of aspiration, this

risk being high in toothless elderly people. It is also possible to combine functionality and sensoriality because where traditional food substitutes (porridge, high-protein gels, etc.) are often rejected by consumers, the "food design" aspect can arouse a person's interest in eating by creating a sensation of palatability through appearance (shape, color, etc.).

According to Zhao et al. (2020), the filling pattern, as well as the surface/volume ratio, are of great importance, not only for the texture and geometry of a printed food but also for the fate of the active compounds that may have been added during preparation. This is the case for probiotics, which have a much better survival rate after cooking, in the case of honeycomb filling, and for a high surface/volume ratio. Besides probiotics, other compounds with active ingredients are also being researched to study their release in the digestive tract following encapsulation with new edible bioplastics. It is possible to upcycle plant by-products to exploit their physical and mechanical properties in the food and pharmaceutical fields. This is the case for zein, a protein derived from maize residues that can be recovered as a bioplastic and then extruded to make 3D printed edible objects. Although its nutritional value is low (low levels of essential amino acids), this protein is nevertheless recognized as safe for human consumption by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). When zein is combined with a glycerol-type plasticizer, its properties become of interest in the food sector, as the printed zein-based material can then act as a water barrier in complex multi-layered, multi-ingredient foods (Chaunier et al., 2017). It can also lead to useful solutions for texturing foods intended for people with masticatory deficiencies, by making it possible to couple low resistance to breaking with a high fragmentation rate. These properties allow an acceptable mechanical resistance to be maintained for the consumer so that the mouthfeel remains acceptable (Chaunier et al., 2018). The third aspect, adaptive nutrition, is dealt with in Section 5. This type of nutrition through 3DFP, though so far very scantly developed, deserves mention in the context of prospective studies.

4 Main questions around 3DFP

To date, the main questions around this new technology focus on three main points arising from the combined novelty of this technology and the food products it creates. The first point concerns the impacts in relation to the three sustainability pillars (environment, society, economy) of this disruptive process. The second point concerns the acceptability and the perception that consumers have of these new foods that could arrive on the market very soon, particularly with regard to their naturalness (Roman et al., 2017) and their high degree of processing. The last point is also linked to the innovative nature of these foods, which raises the question of how these products, which humans are not used to consuming, should be legally regulated.

4.1 Sustainability of 3DFP

Very few studies published to date have investigated the sustainability of 3DFP. However, several studies have attempted to assess the sustainability of 3D printing in general, in industrial fields where it is particularly well developed (Colorado et al., 2020). It is therefore possible to draw some concrete findings from this work and transpose them to the case of 3DFP.

Several studies have focused on the environmental impacts of additive manufacturing, by assessing energy consumption (electricity) or estimating the potential savings in raw materials or waste management (Khosravani and Reinicke, 2020; Peng, 2016). According to Kellens et al. (2017), the energy required per manufacturing unit is one to two times higher for 3D printing than for conventional machining or injection molding. Le Bourhis et al. (2014) found that in the case of 3D printing, the consumption of raw materials impacted the environment more than the electricity consumption itself. According to Peng (2016), five actions, which apply perfectly to 3D printing, can reduce the impact of carbon emissions: (i) reducing the need for raw materials, (ii) reducing the use of industrial processes that consume a great deal of energy and raw materials, (iii) optimizing the performance of processes to design products efficiently and flexibly, (iv) reducing the mass of components to reduce the carbon footprint of means of transport, and (v) limiting the impact of logistics, by ensuring that manufacturing is carried out as close as possible to the areas of consumption. Kietzmann et al. (2015) confirm the last point, stating that additive manufacturing reduces inventories while allowing the recycling and reuse of printed materials. Besides the technique itself, the way it is used (i.e., the user profile) also has some influence over the environmental impacts of printed products and should be considered in the life cycle analyses (LCAs) that are carried out (Barros and Zwolinski, 2016). Much work remains to be done to dispel some of the approximations made, particularly in LCAs or in the impacts this 3D technology may have on human health and air pollution (Khosravani and Reinicke, 2020; Rejeski et al., 2018).

Consideration of the other two aspects of sustainability—the social and economic impacts of 3DFP—is still in its infancy. Regarding the social impact, Huang et al. (2013) have indicated that from a technical point of view, 3D printing could have a positive impact on society, through the production of personalized health products that could improve people's

health and quality of life, through a reduction in environmental impact, and through a simplification of the supply chain, increasing efficiency and responsiveness in meeting demand. On the other hand, these same authors indicated that 3D printing could potentially impact society negatively if energy consumption throughout the product lifecycle and the occupational health of professionals using additive manufacturing were poorly controlled. More recently, through an example relating to the production of socially oriented mobile phones, Beltagui et al. (2020) showed that 3D printing could have a positive social impact, provided there was a concomitance between the availability of 3D printers, consumer attitudes towards social sustainability and the market entry of new products. In this context, 3D printing can offer a solution, leveraging the voluntary effort of individuals through open design and distributed production, and help overcome resource constraints, thus supporting the dissemination of innovation in a socially sustainable supply chain.

To understand the economic impact of 3D printing, it should be borne in mind that the main advantage of this technique lies in personalization, allowing a 3D digital model to be transformed directly into a physical product, whereas the personalization with conventional production methods is very costly, particularly because of the automation of processes required by mass production. Even if the energy cost of 3D printing is still high compared to traditional manufacturing, its flexibility in use for small series and niche markets makes it a method of choice (Thakur and Modi, 2020). According to Weller et al. (2015), 3D printing technology makes it possible to manufacture personalized products with reduced manufacturing costs, as it requires no tools or molds. It also enables the production of complex functional design objects in a single step, potentially reducing the need for assembly work. Additive manufacturing offers a high degree of flexibility, which allows the design of highly customized products and lets companies enter new markets or serve several markets at the same time. Another exciting opportunity arising from 3D printing is the ability of consumers to become their own producers, perhaps even competing directly with established manufacturers (Weller et al., 2015). In all cases, the economic impact of introducing 3D printing technology in society is expected to be considered in the future. This technology is often said to herald a third industrial revolution.

4.2 Consumer perception and acceptability

The sensory perception of consumers is a crucial factor for the acceptance of food products, along with the trust that these same consumers place in food (Tuorila and Hartmann, 2020). This acceptance is all the more essential as the food in question will have been designed using new processing technologies, such as 3D printing (Siegrist, 2008). Very recently Mantihal et al. (2020) have indicated that three major factors determine consumer acceptance of 3D food technology, namely knowledge of the technology, sensory perception of 3D printed food, and the benefits that consumers could derive from consuming it.

Regarding knowledge of the technologies, it is obvious that ignorance or misconceptions about emerging food technologies such as 3D printing can be a major obstacle for its acceptance, by fostering uncertainty and ambiguity, and consequently misunderstanding in the minds of consumers. An effective way to raise consumer awareness would be to make good use of marketing to communicate about this new technology and the benefits it is likely to generate at the product level. In this regard, based on the study of data collected in German-speaking Switzerland, Brunner et al. (2018) have shown with regard to 3DFP that the formation of consumer opinion is strongly conditioned by first impressions, following the first information they receive, thus confirming the major role of the first communication. These authors have also shown that well-designed communication has the power to positively shape the attitudes of some consumers towards 3D printed food, especially those with little or no prior knowledge of the subject. On the other hand, other consumers remain reticent about this new technology, despite the targeted communication. However, according to Lupton (2017), there is still hope because, unlike most other innovative food technologies, 3DFP, by the action of the news media, is perceived positively by the general public overall, who see it as futuristic, creative, good for human health, efficient and sustainable.

Besides the knowledge of 3D printing technology, the sensory perception of printed food is an essential factor that conditions consumer acceptability. In recent years, several studies have set out to precisely characterize the sensory attributes of various printed foods, such as appearance, taste, smell, and color in the case of smoothies printed from fruits and vegetables (Severini et al., 2018b) or the texture of a cheese extruded at different speeds (Le Tohic et al., 2018). These studies concluded that the 3D printing process could, on a case-by-case basis, affect sensory attributes, in particular the color and texture of printed products, in ways that could be favorable, but also unfavorable to consumers (Mantihal et al., 2020). However, few large-scale studies have investigated consumer perceptions of 3D printed foods in general. The Canadian study by Manstan and McSweeney (2019), based on the analysis of two focus groups and the responses of 329 people, did identify the attitudes of consumers towards 3D printed foods, and also their opinion of them compared to conventional foods. Their study showed that the population was divided into three groups: a first group "strongly interested" about the prospect of consuming 3D-printed foods (43% of the population), for whom this type of food was perfectly acceptable

and may even be sustainable; a second group "moderately interested" (30% of the population) who considered them safe and said they were ready to consume them, and a third group (27% of the population) who believed that 3D-printed foods were unacceptable and even unfit for consumption. However, further research is needed to clarify the underlying reasons for the beliefs displayed by certain categories of consumers, together with the role that education could play in the consumption of 3D printed foods (Manstan and McSweeney, 2019).

The third and final overriding factor mentioned by Mantihal et al. (2020) concerns the benefits or advantages that can be derived from a new technology that can facilitate its acceptance, especially if the technology has a positive impact on risk reduction, health, or public safety (Rollin et al., 2011). Regarding 3DFP, besides the design and user-friendliness advantages of this technology, Severini and Derossi (2016) and Portanguen et al. (2019) agree that its main benefit would be the ability to create personalized foods to meet the needs of people with impairments and/or deficiencies. However, consumers will need to be well-informed of this benefit if we are to counterbalance a perception that printed foods, as highly processed foods are not very nutritious or even harmful to health.

Another advantage of 3DFP is that the prior de-structuring of raw materials made obligatory by the process itself could be exploited to reclaim certain raw materials that are regularly lost, wasted, or rejected by consumers, such as offal, or misshapen or non-standard fruit and vegetables. According to a FAO report (Gustavsson et al., 2011), 33% of foodstuffs are wasted or lost each year across the world, i.e., 1.3 billion tons, of which 30% are cereals, 20% meat and dairy products and 45% fruit and vegetables. These raw materials, which are insufficiently valued in human nutrition, therefore include many products rich in proteins and micronutrients. These millions of tons of unused foodstuffs, therefore, represent a considerable source of potentially restructurable raw materials of good nutritional quality (Lupton, 2017; Lupton and Turner, 2016; Lynch et al., 2018; Portanguen et al., 2019). We can also highlight a shortage of scientific literature on this subject.

It would also be possible to use new protein sources with a lower environmental impact, such as insects, which consume little water and can be fed with plant co-products. Here, the physical transformation of raw materials during the 3D printing process also becomes an advantage. Incorporating proteins derived from insects (but why not also from algae or fungi?) into food is now possible and could remove certain barriers to consumption by masking the real appearance of certain products while highlighting their sustainable aspect. Examples include the work of Keerthana et al. (2020) to determine the printing parameters required to print a mixture of wheat flour and fungus powder, or that of Severini et al. (2018a) on food based on insect powder.

As a conclusion to this section on acceptability, it is worth mentioning the work of Caulier et al. (2020) who explored, over 4 weeks, the attitudes of a group of 12 Dutch soldiers towards 3D printed food (recovery snack bars) in a real military context. These authors found that repeated consumption of such products by the military increased their acceptance, as did consumer empowerment, the degree of personalization desired, and the state of development and relevance of 3DFP technology (Caulier et al., 2020). Understanding the level of personalization and food choices desired by consumers, optimizing the sensory profile, and considering the situational aspects of the service that these foods can provide are therefore essential in winning acceptance for 3D printed food.

4.3 Current and future legal framework for 3D-printed food products

As with any food product, the consumption of printed food is liable to adversely affect human health in some ways (presence of allergens, food poisoning, etc.), especially if it is produced in unhygienic conditions, poorly post-treated, or poorly stored. Its production therefore needs to be perfectly supervised. However, as legislation always lags behind the technologies it seeks to regulate, the real question is whether new laws should be specifically generated or whether those already in force are applicable to 3D-printed foods (Tran, 2016).

One of the first legal issues that come to mind is the labeling of 3D-printed foods. Several authors (Baiano, 2020; Tran, 2016) agree in asking for specific labeling, similar to that implemented for foods containing or made from genetically modified organisms (GMOs), to distinguish them fully from conventionally produced foods. According to Tran (2016), this would prevent the risk of food fraud, if ever the food was cheaper to produce by 3D printing than conventionally and the two types of food were visually similar. In the European Union, 3D printed foods should logically be considered as "novel foods" and therefore be governed by the Novel Foods Regulation (*Regulation*, 2015). The term "novel food" applies to innovative foods, foods produced using new technologies and manufacturing processes (so a priori 3D printing), as well as foods that are or have been traditionally consumed outside the European Union. Novel foods must be safe for consumers, properly labeled so as not to mislead consumers, and if ever they have to replace other foodstuffs, they must provide the same nutritional benefit to the consumer. In Canada, owing to the innovative nature of 3DFP and the lack of perspective on the long-term health effects of regular consumption of printed products, all marketing of 3D printed foods must obtain prior approval from the public agency managing human health, namely the Health Canada agency (Baiano, 2020).

Other legal questions are possible, especially concerning certain abuses that could result from 3DFP, such as the possibility of making food from non-consumable waste (expired food, for example), or even no longer from food-grade inks, but directly from the assembly of a multitude of chemical compounds. Finally, irrespective of the field of application, according to Baiano (2020), massive diffusion of 3D printing technology in society could lead to an increase in illegal printing of products, and jeopardize the protection of intellectual property and innovation.

5 Emerging trends and long-term prospects

Since the recent advent of 3DFP, no printed food has yet been made available on the market. In this section, we propose a prioritization of the concepts to be implemented so that 3D printed food can become regularly available in the medium term. These steps are essential for companies or research institutes to lay the foundations for large-scale manufacturing, develop the sale of printers for industrial operators, and also for private individuals or personalize food. However, in our opinion, 3DFP must go far beyond these considerations, and be a stakeholder in the societal changes to come, which tend towards more balanced, but also more responsible eating habits (reduction of losses and wastage), and more sober and efficient processes. In the second part of this section, we also examine the trends set out in the literature and several prospective projects in progress. Finally, we extrapolate what could be the development and applications of 3DFP in the very long term, assuming that aspects of sustainable development and adaptation to environmental constraints will condition this development.

5.1 Possible applications in the short or medium term and remaining hurdles

What culinary 3D printers already exist on the market? Although their presence among professionals or individuals is still marginal, there are currently a few dozen on the market: ChefJet from 3D Systems, Foodini from Natural Machines, Chef3D from BeeHex, etc. Their cost is still quite high and can reach several thousand euros, depending on their sophistication. For the moment, their use is limited to culinary design, and the printing of meat products without additives remains challenging. Nevertheless, these machines are starting to reach a high technological level, allowing them to extrude several ingredients for the same recipe or even offer the possibility of creating or recognizing, and then reproducing shapes via a camera or scanner. Overall, the depositing system is relatively well automated, and the user can have access to settings to optimize printing (flow rate, speed, etc.). Some manufacturers claim that within two decades, 3D printers will have invaded most domestic kitchens, like microwave ovens. This is a possibility requiring, however, that a certain number of hurdles be crossed soon. First of all, printing your own food will not be a press-button process. Several operations are and will remain necessary, unless you buy ready-to-use food cartridges, at a cost and with an environmental impact that is far from negligible, but which has yet to be evaluated. Take the example of a vegetable-based preparation: the user will have to peel, cut, cook, mix, possibly add a texturizing additive (depending on the raw material and the shape to be printed), and finally fill the printer cartridges. All of this put together means that the time spent in the kitchen may not be very different from that spent preparing a traditional meal. Furthermore, in the current state of technology, 3D printing for domestic culinary products does not allow for a correct dietary balance, as some products are difficult to print in their current states, such as meat, dairy, and egg products. An imbalance, a deficit, or even a protein deficiency may therefore affect a consumer using this technology daily to eat. From a nutritional point of view, a person who does not consume animal proteins must consume, in their diet, 15%–20% more, by mass, of vegetable proteins for a balance in essential amino acids, not to mention vitamins B3 and B6 (Kondjoyan et al., 2018) or micronutrients (e.g., iron) that are absent or have a lower bioavailability in vegetable products than in animal products. The user of the culinary 3D printer will therefore need to be aware of these aspects, especially if printing animal products remains problematic, even in the future.

Temperature control

The existing machines, most often designed for the general public, sometimes seem incompatible with an overall mastery of the process, which we consider essential. This is particularly the case with temperature regulation at the level of the product to be printed. These systems are most often based on the response of a thermocouple-type temperature sensor placed at the level of the casing that accommodates the cartridge containing the product. This has two major drawbacks: (i) the sensor location is remote from the core of the cartridge, whose diameter can be several tens of millimeters, and (ii) the cartridges, which are made of 316 L stainless steel, are mandatory due to food contact, therefore have a thermal conductivity of 15 $W.m^{-1}.K^{-1}$, which is rather low compared, for example, to that of aluminum (237 $W.m^{-1}.K^{-1}$). These two constraints combined preclude knowing and precisely regulating the temperature of the product before printing

unless it is placed in the cartridge and in the printer for several tens of minutes before the operation. Furthermore, when printing a complex product, not intended for immediate consumption, it may be necessary to hot-extrude it, but its deposition may also be facilitated by a lower temperature. The difference in temperature between the nozzle and the plate can then be beneficial for the setting of the first layers deposited. This method could be considered, particularly for meat products, to potentiate intrinsic gelling properties. However, the thermal gradient will be marked from the very first layers deposited (several °C over a few millimeters), the cooling effect of the plate therefore quickly becoming very limited. An air jet cooling system could nevertheless be considered, if necessary. This type of device should be used under correct conditions so as not to promote bacterial contamination or oxidation due to a regular supply of oxygen.

The literature provides abundant data concerning printing settings for different matrices, showing that the temperature at which printing takes place is of great importance. The overall control of thermal regulation will be all the more crucial as production will be carried out on a large scale if we want to move toward product standardization (Dick et al., 2019a). Rando and Ramaioli (2021) also underlined the relationship between flow velocity and temperature for chocolate printing.

Mastering the post-treatment: Heating

When printing food, food inks can be either raw or cooked. If they are already cooked, it may be sufficient to keep the product at the right temperature until tasting; this is a perfectly feasible technical solution, provided that the holding temperature is compatible with the printability parameters of the products and with their expected organoleptic properties. However, when printing products from raw edible inks, there is still the problem of heating or, more generally, post-treatment. In this chapter, the term post-processing is mainly used to refer to heating and cooking, but it can also encompass several other post-printing unit operations such as drying, freeze-drying, and deep-freezing/freezing. This post-processing is certainly one of the major obstacles that 3DFP must overcome.

The challenge of post-processing is to preserve the properties acquired during 3D printing, e.g., dimensions, structure, appearance, and nutritional properties, while at the same time making the product safe, i.e., no pathogenic microorganisms and no neoformed compounds harmful to human health. Today, it is difficult to combine printing and post-processing in the same device. Although there are culinary printers with heated trays, it is only possible to cook relatively flat food, due to thermal conduction problems and lower temperatures than in a traditional oven. Temperatures that are too high (200–220°C) could damage the printer and might release toxic substances from the plastic components of the device. Cooking at low temperatures (<100°C) has both advantages and disadvantages. The advantages include the preservation of nutritional and organoleptic qualities. The disadvantages include an increased health risk in the case of temperatures below 60–65°C, a risk of undercooking or cooking heterogeneities resulting from poor heat transfer, and finally a necessarily longer cooking time. Cooking time is an important variable because besides the preparation time and printing time, low-temperature cooking in air will need a long time to reach the desired core temperature. For this reason, this type of cooking is generally carried out in a water bath to maximize heat transfers, which would require this post-processing step to be performed outside the printer. This approach has already been described in the literature, notably by Feng et al. (2020) and Dick et al. (2019a) who printed food made from lean meat, lard—these two ingredients being deposited independently in a predetermined geometry—and guar gum mixed with the lean meat, to reproduce the appearance of a traditional minced steak, before vacuum-cooking them at 95–100°C. For this type of food, cooking causes changes such as shrinkage, which results first from the denaturing of proteins, which by contracting, expel a mixture of water and nutrients, and second from a loss of fat by melting. In their study of printed foods, Dick et al. (2019b) also observed shrinkage and cooking losses, which increased with increasing fat content. The cooking behavior of these printed foods is therefore not very different from that of traditional food, although the way in which fat is deposited greatly influences the level of losses. Because the fat is less bound to lean meat, the losses tend to be higher from a printed product. These losses seem to depend on three factors: filling density, fat content, and their interaction (Dick et al., 2019b).

Hertafeld et al. (2019) chose another post-printing cooking method, namely infrared (IR) heating. Trials were carried out with a complex food mixture of sesame paste (including rice flour), chicken paste (including egg white), shrimp paste, wine, grated ginger, and pepper. The mixture was homogenized and the consistency was visually adjusted by adding rice flour until a printable food ink was obtained. This preparation was processed according to three technological paths: 3D printing without cooking, 3D printing with in situ IR heating, and manual production with oven heating. The results showed that cooking did not cause any significant distortion to the dimensions of the printed food. The study found that cooking layer by layer prevented sagging just after extrusion. Stiffening the lower layer also helped maintain a constant distance between the nozzle and the newly extruded layer, which helped the product keep its shape. We note that the use of this technology required the use of an equation to relate the temperature of the radiation from the IR spot, the distance from the feed, and the intensity of the IR spot. This study showed that it was possible to cook a 3D printed food in situ, but

unfortunately, it lacked a sensory analysis or a study of the mechanical properties of the food after cooking to assess consumer acceptability. It is difficult to assess the real impact of this cooking method on the nutritional properties, microbiological quality (especially at the core), and chemical safety (harmful neoformed compounds) of the food. These health concerns must, of course, be placed at the center of post-processing of printed food intended for consumption (Hertafeld et al., 2019). Other post-processing solutions have been studied, such as radio-frequency cooking/sterilization (Jiang et al., 2020) in applications for space flights. Given the context of the application, microbiological safety must be perfectly controlled, as well as certain organoleptic properties such as texture, flavor, or color. The scales used, ranging from 90°C/10 min to 110°C/30 min, were certainly effective against microorganisms, but were also certainly detrimental to organoleptic properties, especially at the highest temperature applied for the longest time.

Another on-board cooking solution is about to become available in turnkey culinary printers, namely laser cooking. This technology is being developed in organizations such as Columbia University (USA) or private companies such as Natural Machines, manufacturer of the Foodini 3D culinary printer. This method offers at least two advantages: (i) high cooking precision, with possible cooking layer by layer, so gaining in homogeneity, and (ii) a limitation of the heating temperature because the external surfaces need no longer be overheated to obtain the correct core temperature. The risk of generating harmful neoformed compounds is thus reduced. The simplest solution in principle is still to use forced hot air with a targeted airflow. This may seem simple at first glance, but successfully controlling heat transfers on an object of variable geometry, or even during manufacture, can be very complex. This would require channeling the hot air flow through precisely positioned nozzles. These could be mobile to adapt to the geometry of the object as best as possible. Such a device would need a servo-controlled print-head displacement system.

Each of these technologies has its advantages and disadvantages. They now have to be applied outside the laboratory. However, this cannot be done without considering both economic costs and environmental impacts. The process must be profitable without the amount of energy required to cook printed food having to exceed that of traditional cooking (in kWh/kg of food).

The health issue

Innovation in food behavior may be welcomed or distrusted, but either way, consumers demand nutritionally healthy, safe food. Whether in the context of mass manufacturing or smaller-scale production, product development will be subject to microbiological and chemical constraints, particularly regarding oxidation. This last point has been scantly studied in the literature, with most authors working on adding antioxidants to the matrix (Vieira et al., 2020) to improve its properties rather than studying the impact of the process on these oxidation phenomena. To our knowledge, only Severini et al. (2018b) have studied the loss of antioxidant capacity of a printed fruit- and vegetable-based food, highlighting no significant loss of antioxidant capacity for at least 6 days. However, in the case of 3D printing of animal products containing fat and myoglobin in particular, no study has yet addressed this issue. Food printing times vary depending on the complexity of the desired geometry, nozzle diameter, and extrusion throughputs and speeds. For a portion intended for an adult, times of 10–20 min are realistic for printing one of the items in a dish. If we add an in situ post-treatment at a relatively low temperature, it is easy to estimate that the making of the dish, from the preparation of the raw materials to the output of the printer, will take several tens of minutes or even an hour. Technical solutions must therefore also be considered to limit excessive oxidation of the printed food, such as working in oxygen-reduced enclosures.

Relevant microbiological studies are also scant. However, the few studies published (Severini et al., 2018b) seem to indicate that bacterial contaminations come essentially from the process and not from the raw materials. Compared to food 3D printers modified in the laboratory, of the type developed by Bégin-Drolet et al. (2017), dedicated commercial printers have the advantage of allowing proper cleaning of the various parts of the system. Tomorrow's models of 3D food printers, intended for the nutrition of people in hospitals or care institutions, will have to guarantee irreproachable microbiological safety. This will be through a thorough optimization of the process and the printing material and not through the incorporation of preservatives in the printed food. Besides the microbiological quality of the printed food, it will also be necessary to investigate the issue of chemical safety. During printing, the food undergoes a number of chemical changes and is subjected to different heating cycles during extrusion and/or during post-processing, with potential generation of neoformed compounds harmful to human health.

Possible applications in the short- and medium-term

In Western countries, the current trend in consumption is flexitarianism, which translates into a reduction in meat consumption, for health, ecological, or ideological reasons. Companies around the world are thus working on substitutes, particularly meat substitutes, to accompany these changes in consumption patterns. 3D printing is currently contributing to the

development of two trends that are expected to emerge in the next 5–10 years in various countries around the world: the cultivation of muscle cells and the manufacture of "meat-free" meat. Their primary aim is to limit, or even eliminate husbandry to improve animal welfare, to save the water resources and arable land used to produce food for livestock, and to curb the emission of greenhouse gases. We now examine these two trends in detail.

It is quite possible to produce muscle tissue by cell culture without using 3D printing, but as stated by Zhang et al. (2020), there is an urgent need to use this technology for the production of synthetic meat. At present, meats made from stem cells are poorly structured, or in any case do not have a structure sufficiently close to the structure of meat from an animal for the consumer to have a real feeling of chewing, which may lessen the acceptability of this type of product. In the longer term, such products could impair the oral health of consumers for whom we know that excessive, regular consumption of soft foods leads to a loss of chewing capacity. To remedy this, one solution could be for the 3D printing method to use projected droplets. This would make it possible to reshape the structure of artificial meat, making it more elastic, and also more compact, lending cultured meat a more real, meat-like appearance. The insight that 3D printing can play a major role in the production of cultured meat is also shared by Handral et al. (2020). Although the cultivation of muscle fibers dates back to 1971 (Ross, 1971), it was developed only in the 2000s and the first "tasting" did not take place until 2013. Only very recently it started to emerge from the laboratories under the impetus of companies such as Memphis Meat (USA), which is starting to reduce production costs that were until then prohibitive. Importantly, these production methods, though safe and friendlier to the environment and animal welfare than conventional production methods, still consume raw materials, e.g., amino acids, growth factors, etc. How can we ensure the supply of these materials on an industrial scale? Will they come from the plant sector? If so, how much arable land will they need? Or will we still have to rely on animal resources? In any case, food-oriented bio-printing is attracting the interest of major market players; for example, the fast-food group KFC, in partnership with the Russian company 3D Bioprinting Solutions, has just announced its intention to bio-print chicken nuggets from animal (chicken) cells and vegetable proteins. This approach by the KFC group is interesting insofar as it allows a sharing of protein sources between animals and vegetables. Moreover, from a process point of view, the addition of plant material in the form of fiber or complex carbohydrates such as pectin or starch can also be used to facilitate the texturing of the food, while reducing the need for gelling additives.

Concerning the production of meat substitutes, the Spanish company Novameat has developed a process for printing a food based solely on vegetable products, which has the shape of a real ground meat patty. Pea and seaweed proteins are used to help control the four properties necessary for the success of the process: taste, appearance, texture and nutritional properties. The company has already succeeded in obtaining a promising texture, close to that of muscle tissue, with vegetable microfibers (3D natives, 2019). For taste and appearance, the FDA has just approved the use of leghemoglobin as a coloring additive in products similar to uncooked ground beef (Durell, 2019). This form of hem, extracted from soya roots, is an additive that gives the vegetable analogue, besides the color, a flavor similar to that of meat. The company Impossible Food (USA) has developed a process for extracting this leghemoglobin from a genetically modified yeast, with a view to industrial production. However, it must be said that these meat substitutes based on vegetable extracts are likely to offer a lower nutritional intake, in equal quantities, than a meat food, particularly in essential amino acids. The diet will therefore have to be rebalanced accordingly.

In our opinion, the main outlet for 3DFP in the years to come will be bringing real added value to the health of seniors by offering personalized nutrition to people living in care institutions. A few specific initiatives in this direction are beginning to appear. We can cite, for example, the hospital of the University of Information Technology (Utah, USA), where food is printed with a Foodini (Natural Machines) printer to create more pleasant and more appropriate meals for dysphagic patients. It is therefore reasonable to expect the potential targets of this type of food to be for people of all ages suffering from health disorders or recovering from illness, and elderly people whose chewing deficiencies compel them to make considerable changes to their diet. Diet must be adapted for different ages and different health conditions, particularly in terms of protein intake. In France, the recommended daily intake for a healthy, fit adult is at least 0.83 g of protein per kg of body weight. This recommendation increases to 1.0 g/kg/day for people over 60 years old (ANSES, 2019). Besides protein intake, the texture of food should also be adjusted to the age and chewing capacity of individuals. On these two points, 3DFP can, in the medium term, provide concrete answers, once this technology has been perfectly mastered, particularly in terms of health safety, which still requires the development of adapted post-processing methods.

5.2 Main trends for the food of the future by 3D printing

The texture of printed foodstuffs is a key issue, especially for animal products and meat, for which the use of texturizing additives is still a requisite. Many studies are therefore currently focusing on the rheological properties of food inks and their behavior throughout the entire printing system (Sun et al., 2018). They show that each printed food product has its own

optimal printing conditions. However, as this work is long and tedious, we consider that it would be wise to work on modeling and simulation concepts that would make it possible (i) to predict the behavior of any particular food ink during printing, taking into account the geometry and characteristics of the printing system, and (ii) to identify the optimal printing conditions, as in the work of Jonkers et al. (2020) or Serdeczny et al. (2019).

4D printing is a concept that emerged in 2013 (Miao et al., 2017), with applications in various fields, such as medicine and materials science, and more recently, food (Le Bail et al., 2020). The idea of 4D food is to increase and improve the functionality of food or, more simply, to change its shape as a function of time, or under the action of a stimulus, such as a temperature or humidity (Zhao et al., 2020). At present, the few studies on this topic focus on changes in shape, color as a function of pH (He et al., 2020) or possibly taste as a function of food composition (so far only of plant origin), which restricts the application of the 4D concept to culinary design. Nevertheless, this aspect could be useful to stimulate the appetite for and appeal of specific foods in certain population groups (such as children, see Section 3). Although 4D food printing is promising, there may be pitfalls. Changes to food caused by a stimulus can take place only before ingestion because chewing destroys the product. Even so, it is possible to imagine modifying certain properties of food, in order, for example, to increase its shelf life. With this in mind, it is possible to imagine micro-encapsulated natural preservatives that could be released, and that would diffuse passively, in the event of temperature changes (breaking the cold chain), to preserve the product for a set period. The change in color could also enable a consumer to quickly assess the freshness of food that has changed color following a drop in pH, a sign of bacterial growth.

The "adaptive nutrition" approach mentioned in Section 3, in connection with 3DFP, is most likely to be the most innovative. One advantage of additive manufacturing, whatever the field of application, is its ability to design and manufacture locally (Lupton, 2017; Lupton and Turner, 2016). This is of particular interest for people working in hostile, isolated or confined environments. Numerous projects have been developed, particularly for military personnel deployed in war zones. The US Army and US Navy have already embarked on a program aiming to create food perfectly adapted to the needs of soldiers, available on demand, and limiting logistical costs and waste during packaging. It will be possible to take the concept even further, using locally available resources to supplement rations.

The aerospace industry is also a business sector keenly interested in this approach. In 2016, NASA (National Aeronautics and Space Administration) worked on the development of a machine to print pizzas that can be used by astronauts, from food ingredients placed in cartridges with very long conservation. Very recently, Jiang et al. (2020), starting from a printed food designed for the general public, developed semi-liquid paste solutions, rich in dietary fiber, for use by taikonauts. Combining yam (vegetable fiber) with chicken (animal protein), this study showed that the nutrient supply could be ensured while allowing diversification of recipes for space flight and meeting the psychological needs of personnel. The constraints related to the post-treatment and conservation of these products were also addressed in this study. To potentiate the conservation and ensure the maintenance of the sensory properties, the authors showed that the association of three elements or techniques was necessary, namely a natural preservative (ε-polylysine), a thermoelectric treatment of radio-frequency type, and an adapted barrier packaging. For space applications, 3DFP can thus produce safe, healthy food that is also appealing and stimulating for confined personnel. In this specific field of application, the recovery of co-products and the recycling of raw materials will have to be taken to extremes in places where supply is extremely difficult, scarce or prohibitively costly (e.g., space station, moon, future trips to Mars).

6 Conclusion, opportunities, and future challenges

3DFP is a technology that will enable us to change how we think about food with, among other things, new functionalities for printed food and the incorporation of new sources of protein in our diet. Owing to its modularity, 3DFP is a technology that lets us give free rein to our imagination in both aesthetic and technological ways. Schifferstein (2016) advocates strengthening the place of designers in the food industry to approach innovation in a different, holistic way. This would mean the development of new specific tools to manage a product development process, integrating and bringing together knowledge from different disciplines. This more holistic approach could help reconcile the consumer with the food by integrating ethical, regional, and seasonality aspects of products while promoting contact with agriculture, trade, and the processing industry.

Functionality and personalization are the key concerns that will shape the future of 3DFP. Even if mass production of certain foods begins in the short to medium term, without environmental awareness (e.g., to limit waste and wastage) or a nutritional benefit, these solutions are likely to fail. A start-up in the Netherlands, Upprinting Food used the concept of circular economy to create printed dishes from still edible food waste (bread, fruit, and vegetables). It remains to be seen how this interesting initiative can be applied on a larger scale—should it be done at home so that everyone limits their own waste? Should it take place in factories to guarantee and facilitate access to the raw material by producers or wholesalers?

As already mentioned, the dimension of a balanced diet still needs to be considered. Animal proteins will probably have to be associated with this approach, both for nutritional reasons and to limit losses and waste in this sector. It will then be necessary to address the health aspects, which are much less straightforward than for plant products. On the other hand, 3DFP cannot be limited to the recycling of foodstuffs at the end of their cycle. It must also be able to use "fresh" resources by optimizing their use and enabling the development of formulations adapted to needs, and by using tools that enable optimum control of the entire process.

Finally, the world will face major demographic changes in the coming decades owing to its aging population. Food plays a fundamental role in enabling people to live longer in good health. 3DFP can contribute to human longevity by making it possible to design new foods for the elderly. Food that will be more suitable, more accessible, and more sustainable. In sum, 3DFP can have a bright future provided that a certain number of scientific, technological, economic, and sociological obstacles are overcome. Ideas are constantly emerging and research is making rapid advances. Researchers and industrial operators must now take on the present and future challenges to democratize this technology for more sustainable food.

References

3D natives, 2019. La viande imprimée en 3D est-elle le futur de la viande…sans viande ? Retrieved from https://www.3dnatives.com/viande-imprimee-en-3d-10062019/#!.

ANSES, 2019. Les protéines : Définition, rôle dans l'organisme, sources alimentaires. Retrieved from https://www.anses.fr/fr/content/les-prot%C3%A9ines.

Anukiruthika, T., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C., 2020. 3D printing of egg yolk and white with rice flour blends. J. Food Eng. 265, 109691. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109691.

Augusto, P.E.D., 2020. Challenges, trends and opportunities in food processing. Curr. Opin. Food Sci. 35, 72–78. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.005.

Baiano, A., 2020. 3D printed foods: a comprehensive review on technologies, nutritional value, safety, consumer attitude, regulatory framework, and economic and sustainability issues. Food Rev. Intl., 1–31. https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1762091.

Barros, K.D.S., Zwolinski, P., 2016. Influence of the use/user profile in the LCA of 3d printed products. Procedia CIRP 50, 318–323. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.05.005.

Bégin-Drolet, A., Dussault, M.-A., Fernandez, S.A., Larose-Dutil, J., Leask, R.L., Hoesli, C.A., Ruel, J., 2017. Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. Addit. Manuf. 15, 29–39. https://doi.org/10.1016/j.addma.2017.03.006.

Beltagui, A., Kunz, N., Gold, S., 2020. The role of 3D printing and open design on adoption of socially sustainable supply chain innovation. Int. J. Prod. Econ. 221, 107462. https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2019.07.035.

Brunner, T.A., Delley, M., Denkel, C., 2018. Consumers' attitudes and change of attitude toward 3D-printed food. Food Qual. Prefer. 68, 389–396. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.010.

Buffière, C., Gaudichon, C., Hafnaoui, N., Migné, C., Scilowsky, V., Khodorova, N., Rémond, D., 2017. In the elderly, meat protein assimilation from rare meat is lower than that from meat that is well done. Am. J. Clin. Nutr. 106, 1257–1266. https://doi.org/10.3945/ajcn.117.158113.

Caulier, S., Doets, E., Noort, M., 2020. An exploratory consumer study of 3D printed food perception in a real-life military setting. Food Qual. Prefer. 86, 104001. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104001.

Chaunier, L., Della Valle, G., Dalgalarrondo, M., Lourdin, D., Marion, D., Leroy, E., 2017. Rheology and structural changes of plasticized zeins in the molten state. Rheol. Acta 56 (11), 941–953. https://doi.org/10.1007/s00397-017-1045-9.

Chaunier, L., Guessasma, S., Belhabib, S., Della Valle, G., Lourdin, D., Leroy, E., 2018. Material extrusion of plant biopolymers: opportunities & challenges for 3D printing. Addit. Manuf. 21, 220–233. https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.03.016.

Colorado, H.A., Velásquez, E.I.G., Monteiro, S.N., 2020. Sustainability of additive manufacturing: the circular economy of materials and environmental perspectives. J. Mater. Res. Technol. 9 (4), 8221–8234. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.062.

Dankar, I., Haddarah, A., El Omar, F., Sepulcre, F., Pujola, M., 2018a. Assessing the microstructural and rheological changes induced by food additives on potato puree. Food Chem. 240, 304–313. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.121.

Dankar, I., Haddarah, A., El Omar, F., Sepulcre, F., Pujolà, M., 2018b. 3D printing technology: the new era for food customization and elaboration. Trends Food Sci. Technol. 75, 231–242. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.018.

Derossi, A., Caporizzi, R., Azzollini, D., Severini, C., 2018. Application of 3D printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. J. Food Eng. 220, 65–75. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.015.

Dick, A., Bhandari, B., Prakash, S., 2019a. 3D printing of meat. Meat Sci. 153, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.03.005.

Dick, A., Bhandari, B., Prakash, S., 2019b. Post-processing feasibility of composite-layer 3D printed beef. Meat Sci. 153, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.024.

Durell, K., 2019. Meat-alternatives: FDA approves soy leghemoglobin as color additive following Impossible Foods petition. Retrieved from https://www.foodingredientsfirst.com/news/meat-alternatives-fda-approves-soy-leghemoglobin-as-color-additive-following-impossible-foods-petition.html.

Evans, G., de Challemaison, B., Cox, D.N., 2010. Consumers' ratings of the natural and unnatural qualities of foods. Appetite 54 (3), 557–563. https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.02.014.

Fardet, A., Richonnet, C., Mazur, A., 2019. Association between consumption of fruit or processed fruit and chronic diseases and their risk factors: a systematic review of meta-analyses. Nutr. Rev. 77 (6), 376–387. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz004.

Farouk, M.M., Yoo, M.J.Y., Hamid, N.S.A., Staincliffe, M., Davies, B., Knowles, S.O., 2018. Novel meat-enriched foods for older consumers. Food Res. Int. 104, 134–142. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.033.

Feng, C., Zhang, M., Bhandari, B., Ye, Y., 2020. Use of potato processing by-product: effects on the 3D printing characteristics of the yam and the texture of air-fried yam snacks. LWT- Food Sci. Technol. 125, 109265. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109265.

Godoi, F., Prakash, S., Bhandari, B., 2016. 3d printing technologies applied for food design: status and prospects. J. Food Eng. 179, 44–54.

Godoi, F., Bhandari, B., Prakash, S., Zhang, M., 2019. Fundamentals of 3D Food Printing and Applications. Academic Press.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A., 2011. Pertes et gaspillages alimentaires dans le monde - ampleur, causes et prévention. In: Save Food. FAO, Rome, Dusseldorf, Germany.

Handral, H.K., Hua Tay, S., Wan Chan, W., Choudhury, D., 2020. 3D printing of cultured meat products. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1–10. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1815172.

Hao, L., Mellor, S., Seaman, O., Henderson, J., Sewell, N., Sloan, M., 2010. Material characterisation and process development for chocolate additive layer manufacturing. Virtual Phys. Prototyping 5 (2), 57–64. https://doi.org/10.1080/17452751003753212.

He, C., Zhang, M., Guo, C., 2020. 4D printing of mashed potato/purple sweet potato puree with spontaneous color change. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 59, 102250. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102250.

Hertafeld, E., Zhang, C., Jin, Z., Jakub, A., Russell, K., Lakehal, Y., Lipson, H., 2019. Multi-material three-dimensional food printing with simultaneous infrared cooking. 3D Printing Addit. Manuf. 6 (1), 13–19. https://doi.org/10.1089/3dp.2018.0042.

Huang, S.H., Liu, P., Mokasdar, A., Hou, L., 2013. Additive manufacturing and its societal impact: a literature review. Int. J. Adv. Manuf. Technol. 67 (5–8), 1191–1203. https://doi.org/10.1007/s00170-012-4558-5.

Irwin, M., 2007. Caramel-Pumping 3D Fabricator Has Couple on a Sugar High. Wired Magazine.

Jiang, J., Zhang, M., Bhandari, B., Cao, P., 2020. Development of Chinese yam/chicken semi-liquid paste for space foods. LWT- Food Sci. Technol. 125, 109251. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109251.

Jonkers, N., van Dommelen, J.A.W., Geers, M.G.D., 2020. Experimental characterization and modeling of the mechanical behavior of brittle 3D printed food. J. Food Eng. 278, 109941. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109941.

Karyappa, R., Hashimoto, M., 2019. Chocolate-based ink three-dimensional printing (Ci3DP). Sci. Rep. 9 (1), 14178. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50583-5.

Keerthana, K., Anukiruthika, T., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C., 2020. Development of fiber-enriched 3D printed snacks from alternative foods: a study on button mushroom. J. Food Eng. 287, 110116. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110116.

Kellens, K., Mertens, R., Paraskevas, D., Dewulf, W., Duflou, J.R., 2017. Environmental impact of additive manufacturing processes: does AM contribute to a more sustainable way of part manufacturing? Procedia CIRP 61, 582–587. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.11.153.

Khosravani, M.R., Reinicke, T., 2020. On the environmental impacts of 3D printing technology. Appl. Mater. Today 20, 100689. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100689.

Kietzmann, J., Pitt, L., Berthon, P., 2015. Disruptions, decisions, and destinations: enter the age of 3-D printing and additive manufacturing. Bus. Horiz. 58 (2), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.bushor.2014.11.005.

Kim, H.W., Lee, I.J., Park, S.M., Lee, J.H., Nguyen, M.-H., Park, H.J., 2019. Effect of hydrocolloid addition on dimensional stability in post-processing of 3D printable cookie dough. LWT- Food Sci. Technol. 101, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.019.

Kondjoyan, A., Portanguen, S., Duchène, C., Mirade, P.S., Gandemer, G., 2018. Predicting the loss of vitamins B3 (niacin) and B6 (Pyridoxamine) in beef during cooking. J. Food Eng. 238, 44–53. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.008.

Lai, W.H., Cheng, C.I., 2008. United States Patent No.

Le Bail, A., Maniglia, B.C., Le Bail, P., 2020. Recent advances and future perspective in additive manufacturing of foods based on 3D printing. Curr. Opin. Food Sci. 35, 54–64. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.009.

Le Bourhis, F., Kerbrat, O., Dembinski, L., Hascoet, J.-Y., Mognol, P., 2014. Predictive model for environmental assessment in additive manufacturing process. Procedia CIRP 15, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.procir.2014.06.031.

Le Tohic, C., O'Sullivan, J.J., Drapala, K.P., Chartrin, V., Chan, T., Morrison, A.P., Kelly, A.L., 2018. Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. J. Food Eng. 220, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.003.

Lee, C.P., Karyappa, R., Hashimoto, M., 2020. 3D printing of milk-based product. RSC Adv. 10 (50), 29821–29828. https://doi.org/10.1039/d0ra05035k.

Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S., Sozer, N., 2018. Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. J. Food Eng. 220, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034.

Lipton, J., 2017. Printable food: the technology and its application in human health. Curr. Opin. Biotechnol. 44, 198–201. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.015.

Lipton, J., Cutler, M., Nigl, F., Cohen, D., Lipson, H., 2015. Additive manufacturing for the food industry. Trends Food Sci. Technol. 43 (1), 114–123. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.004.

Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B., Yang, C., 2018a. Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing. J. Food Eng. 220, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.017.

Liu, Y., Liu, D., Wei, G., Ma, Y., Bhandari, B., Zhou, P., 2018b. 3D printed milk protein food simulant: improving the printing performance of milk protein concentration by incorporating whey protein isolate. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 49, 116–126. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.018.

Liu, Y., Liang, X., Saeed, A., Lan, W., Qin, W., 2019a. Properties of 3D printed dough and optimization of printing parameters. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 54, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.008.

Liu, L., Meng, Y., Dai, X., Chen, K., Zhu, Y., 2019b. 3D printing complex egg white protein objects: properties and optimization. Food Bioproc. Tech. 12 (2), 267–279. https://doi.org/10.1007/s11947-018-2209-z.
Liu, Y., Yu, Y., Liu, C., Regenstein, J., Liu, X., Zhou, P., 2019c. Rheological and mechanical behavior of milk protein composite gel for extrusion-based 3D food printing. LWT- Food Sci. Technol. 102, 338–346. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.053.
Lupton, D., 2017. 'Download to delicious': promissory themes and sociotechnical imaginaries in coverage of 3D printed food in online news sources. Futures 93, 44–53. https://doi.org/10.1016/j.futures.2017.08.001.
Lupton, D., Turner, B., 2016. Both fascinating and disturbing': consumer responses to 3D food printing and implications for food activism. In: Schneider, K.E.T., Dolan, C., Ulijaszek, S. (Eds.), Digital Food Activism. Routledge, London, p. 17.
Lynch, S., Mullen, A., O'Neill, E., Drummond, L., Alvarez, C., 2018. Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. Meat Sci. 144, 62–73. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.019.
Manstan, T., McSweeney, M.B., 2019. Consumers' attitudes towards and acceptance of 3D printed foods in comparison with conventional food products. Int. J. Food Sci. Technol. 55 (1), 323–331. https://doi.org/10.1111/ijfs.14292.
Mantihal, S., Prakash, S., Godoi, F., Bhandari, B., 2017. Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modeling. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 44, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.012.
Mantihal, S., Prakash, S., Bhandari, B., 2019. Textural modification of 3D printed dark chocolate by varying internal infill structure. Food Res. Int. 121, 648–657. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.034.
Mantihal, S., Kobun, R., Lee, B.B., 2020. 3D food printing of as the new way of preparing food: a review. Int. J. Gastronomy Food Sci. 22, 100260. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100260.
Miao, S., Castro, N., Nowicki, M., Xia, L., Cui, H., Zhou, X., Zhang, L.G., 2017. 4D printing of polymeric materials for tissue and organ regeneration. Mater. Today 20 (10), 577–591. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.06.005.
Nooshkam, M., Varidi, M., Verma, D.K., 2020. Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: a review. Food Res. Int. 131, 109003. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109003.
Peng, T., 2016. Analysis of energy utilization in 3D printing processes. Procedia CIRP 40, 62–67. https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.01.055.
Perez, B., Nykvist, H., Brogger, A.F., Larsen, M.B., Falkeborg, M.F., 2019. Impact of macronutrients printability and 3D-printer parameters on 3D-food printing: a review. Food Chem. 287, 249–257. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.090.
Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., Mirade, P.-S., 2019. Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: a review. Trends Food Sci. Technol. 86, 188–198. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.023.
Rando, P., Ramaioli, M., 2021. Food 3D printing: effect of heat transfer on print stability of chocolate. J. Food Eng. 294, 110415. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110415.
Anon., 2015. Regulation 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on Novel Foods., L327. C.F.R, pp. 1–22.
Rejeski, D., Zhao, F., Huang, Y., 2018. Research needs and recommendations on environmental implications of additive manufacturing. Addit. Manuf. 19, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.addma.2017.10.019.
Rollin, F., Kennedy, J., Wills, J., 2011. Consumers and new food technologies. Trends Food Sci. Technol. 22 (2–3), 99–111. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.001.
Roman, S., Sanchez-Siles, L.M., Siegrist, M., 2017. The importance of food naturalness for consumers: results of a systematic review. Trends Food Sci. Technol. 67, 44–57.
Ross, R., 1971. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J. Cell Biol. 50, 172–186.
Schifferstein, H.N.J., 2016. What design can bring to the food industry. Int. J. Food Design 1 (2), 103–134. https://doi.org/10.1386/ijfd.1.2.103_1.
Serdeczny, M.P., Comminal, R., Pedersen, D.B., Spangenberg, J., 2019. Numerical simulations of the mesostructure formation in material extrusion additive manufacturing. Addit. Manuf. 28, 419–429. https://doi.org/10.1016/j.addma.2019.05.024.
Severini, C., Derossi, A., 2016. Could the 3D printing technology be a useful strategy to obtain customized nutrition? J. Clin. Gastroenterol. 50 (2), S175–S178. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000705. proceedings from the 8th probiotics, Prebiotics & new Foods for microbiota and human health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015.
Severini, C., Azzollini, D., Albenzio, M., Derossi, A., 2018a. On printability, quality and nutritional properties of 3D printed cereal based snacks enriched with edible insects. Food Res. Int. 106, 666–676. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.034.
Severini, C., Derossi, A., Ricci, I., Caporizzi, R., Fiore, A., 2018b. Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. J. Food Eng. 220, 89–100. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.025.
Siegrist, M., 2008. Factors influencing public acceptance of innovative food technologies and products. Trends Food Sci. Technol. 19 (11), 603–608. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.01.017.
Stevenson, M., Long, J., Seyfoddin, A., Guerrero, P., Caba, K.D.L., Etxabide, A., 2020. Characterization of ribose-induced crosslinking extension in gelatin films. Food Hydrocoll. 99, 105324. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105324.
Sun, J., Peng, Z., Yan, L., Fuh, J.Y.H., Hong, G.S., 2015a. 3D food printing—an innovative way of mass customization in food fabrication. Int. J. bioprinting 1 (1), 27–38. https://doi.org/10.18063/IJB.2015.01.006.
Sun, J., Zhou, W., Huang, D., Fuh, J.Y.H., Hong, G.S., 2015b. An overview of 3D printing technologies for food fabrication. Food Bioproc. Tech. 8 (8), 1605–1615. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1528-6.
Sun, J., Peng, Z., Zhou, W., Fuh, J.Y.H., Hong, G.S., Chiu, A., 2015c. A review on 3D printing for customized food fabrication. Procedia Manuf. 1, 308–319. https://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.09.057.
Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D., Lin, L.Y., 2018. Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. J. Food Eng. 220, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.028.

Thakur, M., Modi, V.K., 2020. Emerging technologies in food science—focus on the developing world. Springer.
Tran, J., 2016. 3D-printed food. Minnesota J. Law Sci. Technol. 17 (2), 855–880.
Tuorila, H., Hartmann, C., 2020. Consumer responses to novel and unfamiliar foods. Curr. Opin. Food Sci. 33, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.09.004.
Vieira, M.V., Oliveira, S.M., Amado, I.R., Fasolin, L.H., Vicente, A.A., Pastrana, L.M., Fuciños, P., 2020. 3D printed functional cookies fortified with Arthrospira platensis: evaluation of its antioxidant potential and physical-chemical characterization. Food Hydrocoll. 107, 105893. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105893.
Wang, G., Liu, M., Cao, L., Yongsawatdigul, J., Xiong, S., Liu, R., 2018a. Effects of different NaCl concentrations on self-assembly of silver carp myosin. Food Biosci. 24, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.002.
Wang, L., Zhang, M., Bhandari, B., Yang, C., 2018b. Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. J. Food Eng. 220, 101–108. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.029.
Wegrzyn, T.F., Golding, M., Archer, R.H., 2012. Food layered manufacture: a new process for constructing solid foods. Trends Food Sci. Technol. 27 (2), 66–72. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.006.
Weller, C., Kleer, R., Piller, F.T., 2015. Economic implications of 3D printing: market structure models in light of additive manufacturing revisited. Int. J. Prod. Econ. 164, 43–56. https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2015.02.020.
WHO, 2016. Rapport mondial sur le vieillissement et la santé. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206556/9789240694842_fre.pdf?sequence=1.
Xu, L., Gu, L., Su, Y., Chang, C., Wang, J., Dong, S., Li, J., 2020. Impact of thermal treatment on the rheological, microstructural, protein structures and extrusion 3D printing characteristics of egg yolk. Food Hydrocoll. 100, 105399. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105399.
Yang, F., Zhang, M., Prakash, S., Liu, Y., 2018. Physical properties of 3D printed baking dough as affected by different compositions. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 49, 202–210. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.001.
Zhang, G., Zhao, X., Li, X., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2020. Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. Trends Food Sci. Technol. 97, 443–450. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.026.
Zhao, L., Zhang, M., Chitrakar, B., Adhikari, B., 2020. Recent advances in functional 3D printing of foods: a review of functions of ingredients and internal structures. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1–15. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1799327.

Annexe V 7.

Article « Portanguen et al. (2023) Food Hydrocolloids ».

Food Hydrocolloids 145 (2023) 109096

Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Impact of water content and bloom index on gelatin glycation

Stéphane Portanguen *, Charlotte Dumoulin, Anne Duconseille, Maïa Meurillon, Jason Sicard, Laëtitia Théron, Christophe Chambon, Thierry Sayd, Pierre-Sylvain Mirade, Thierry Astruc

Université Clermont Auvergne, INRAE, UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Glycation
Gelatin
Ultrastructure
Texture
Protein
Initial water content

ABSTRACT

The increasing number of people around the world suffering from chewing disorders necessitates the design of foods adapted to their needs. Glycation could be considered as one of the possible texturing methods. This chemical reaction alters the texture of food products by changing their macromolecular structure. However, there is no consensus on its effects on food texture. In this study, gelatin is used as a model medium to study the effect of glycation on its texture by considering two different Bloom indices (gel strength) and two different initial water contents.

Our results suggest that the initial water content of gelatin, as well as its Bloom index, have an impact on the glycation reaction and on the texture of gelatin gels. The effect of these two factors influences the binding of D-ribose to reactive amino acids, in particular due to a variable amount of gelatin triple helix aggregates.

This study shows the importance of controlling the water content and the Bloom index of gelatin to regulate the glycation reaction when used for food texturing.

1. Introduction

Glycation is a non-enzymatic biochemical reaction of interest for its potential applications in food, where it can potentially modify the texture of food products (Nooshkam, Varidi, & Verma, 2020) by directly affecting the macromolecular structure of the food matrix (Li, Xu, & Xu, 2022). Therefore, the glycation reaction can be considered as an aid for texturizing meat products by 3D printing without the need for food texturizing additives. The glycation reaction forms covalent bonds between the carbonyl (aldehyde or ketone) groups of simple oses and the amine or hydroxyl functions of protein residues (Sun et al., 2021; Wei et al., 2012). These bonds usually form between Lysine and Arginine residues on protein side-chains and with reducing carbohydrates, such as glucose (Liu, Ru, & Ding, 2012). Pentoses, such as ribose, are considered the most reactive oses (Wei et al., 2012). Although glycation holds promise for modifying the texture of food, it has received far more attention since it is implicated *in vivo* in pathologies such as diabetes or, more generally, in cellular aging (Jaisson, Desmons, Gorisse, & Gillery, 2017). The formation of Advanced Glycation End-products (AGEs) during glycation has a detrimental effect on health, regardless of whether they originate from dietary sources or formed in the body. Furthermore, AGEs generated during the advanced stages of the reaction have the potential to accumulate with those produced *in vivo* (Birlouez-Aragon, Morales, Fogliano, & Pain, 2010; Ramasamy, Yan, & Schmidt, 2011). This makes it crucial to lend special focus to these compounds and to evaluate their direct presence in food (Feng et al., 2021).

Gelatin, a biopolymer of animal origin obtained by thermal denaturation or partial hydrolysis of collagen, is a versatile ingredient that enhances the functional properties and texture of foods. Gelatin can change the consistency, elasticity and stability of a food product, because of its gelling, surface-active and emulsifying properties and its ability to form films. Therefore, gelatin offers a viable solution for designing foods for populations with oral deficiencies such as mastica- tory difficulties, dysphagia, or other handicaps (Godoi, Prakash, & Bhandari, 2016; Portanguen, Tournayre, Sicard, Astruc, & Mirade, 2019). However, using gelatin as a base for 3D printing customized foods for these populations proves challenging without the inclusion of additives according to Jiang et al. (2019). While gelatin is readily digestible by the enzymes of the digestive tract (Duconseille, Astruc, Quintana, Meersman, & Sante-Lhoutellier, 2015), it does not contain all the essential amino acids (Table 1). Consequently, incorporating a high amount of gelatin to texturize food does not offer any nutritional benefit. Gelatin has a molecular weight ranging from 15 to 400 kDa (Zhou, Mulvaney, & Regenstein, 2006). The Bloom index, which represents gel strength, and the molecular weight of gelatin share a direct relationship

* Corresponding author.
E-mail address: stephane.portanguen@inrae.fr (S. Portanguen).

https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109096
Received 31 May 2023; Received in revised form 17 July 2023; Accepted 21 July 2023
Available online 21 July 2023
0268-005X/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Amino acid composition of gelatin made from pig skin (g amino acid residues/100 g protein) (borrowed from Eysturskarð et al., 2009).

Amino acid	%
Alanine	8.3
Arginine	8.5
Aspartate	6.0
Cysteine	0.2
Glutamate	10.5
Glycine	20.2
Histidine	0.8
Hydroxylysine	1.2
Hydroxyproline	10.8
Isoleucine	1.3
Leucine	2.9
Lysine	4.0
Methionine	1.1
Phenylalanine	2.1
Proline	13.4
Serine	3.6
Threonine	1.9
Tyrosine	0.8
Valine	2.4

(Netter, Goudoulas, & Germann, 2020; Yang et al., 2022). As Bloom increases, so does the molecular weight. Gelatin also contains small amounts of other molecules, such as lipids, carbohydrates, and ions that are co-extracted with the collagen from the organs used (skin, bones). Its overall composition depends on animal species, source organ, pre-treatment, and extraction process. However, its amino acid composition is the same as the collagen extracted. Gelatin is mainly obtained from the skin, bones, tendons of pigs, cattle or chicken, but also fish bones and scales. During heat treatment, the collagen denatures and solubilizes into the extraction water, losing its fiber conformation. This irreversible denaturation occurs due to the covalent cross-links between the chains, the hydrogen bonds that stabilize the triple helix, and even some of the primary-structure peptide bonds that get broken during heat treatment. The triple helix structure and the hydrogen bonds that stabilize these structures are only partially recovered upon cooling (Eysturskarð, Haug, Elharfaoui, Djabourov, & Draget, 2009). The chains then form triple helix domains separated by areas where the chains are shaped like a random coil. The resulting protein network traps water molecules to form a gel (Duconseille et al., 2015).

Previous work has shown that the glycation reaction occurs in fish gelatin in the presence of lactose (Etxabide, Urdanpilleta, Gómez-Arriaran, de la Caba, & Guerrero, 2017). Glycation-induced cross-linking depends on the concentration of lactose and on the environmental pH (the reaction is favored at pH 10), and the color of the gel (yellow) is considered as a marker of reaction progression. Infrared spectroscopy also demonstrates changes in macromolecular structure of gelatin as a function of these reaction conditions. To our knowledge, the impact of gelatin moisture on the glycation reaction remains unknown. Since the glycation reaction happens at the macromolecular level, the structure of the gelatin at the time this reaction starts may modulate the nature and extent of the molecular interactions. Kozlov and Burdygina (1983) reported that moisture is a major parameter that can influence this structure at two levels: when the gelatin is in dry form (powder, granules, or sheets) and when it is in gel form. They showed gelatin containing more helices absorbs more water from the ambient air. There is little information in the literature regarding the structure of powdered gelatin and its interactions with water. However, controlling the powder form poses the greatest challenge as it is susceptible to variations in environmental conditions during storage or use. It is now accepted that powdered gelatin is in a semi-crystalline form, meaning that it contains both an amorphous phase, consisting of uncoiled gelatin chains, and a crystalline phase in which the gelatin triple helices are present alone or assembled in bundles (Duconseille et al., 2017). Due to interactions with water, the moisture of the gelatin would therefore influence its structure (Duconseille et al., 2015). According to Levine and Slade (1988), water acts as a plasticizer in the amorphous regions of the gelatin powder, providing greater mobility to the protein chains and interacting with the crystalline phase. Consequently, the combination of the air's humidity and the ambient temperature could affect the structure and mobility of the water in the powder.

However, one question remains unanswered: do changes in the ultrastructure of gelatin, induced by variations in water content, have an effect on the course of the glycation reaction? If so, we hypothesize an impact on texture when gelatin is in gel form. This point is fundamental not only for people suffering from loss of mastication, but also for the manufacture of food by 3D food printing. 3D printers currently on the market have significant limitations for the manufacture of meat-based foods. Texturing remains a critical point. We believe that understanding the impact of glycation in a gelatin-based medium, and then directly in meat, could help design new, more adapted and personalized foods.

To answer the scientific question, we built an experiment by varying the water content (low and high) and Bloom index (125 and 200) of gelatin and adding *D*-ribose (Fig. 1). We used a multidisciplinary approach ranging from the measurement of gel color, texture and rheological properties to the molecular characterization of conjugate formation by mass spectrometry and the molecular characterization of ultrastructural changes by transmission electron microscopy.

2. Materials and methods

The nomenclature used to name the different experimental conditions is described in Table 3. The experimental design is summarized in Fig. 1.

2.1. Materials and sample preparation

The gelatins used were of type A, derived from pig skin, with a Bloom index of 125 and 200 and initial water contents of 0.15 and 0.16 kg_{water}/kg_{DM}, respectively (Rousselot®, Girona, Spain). These gelatins were chosen on the basis of their Bloom indices, used in the food industry (Yang et al., 2022; Kuai, Liu, Ma, Goff, and Zhong (2020) and because gelatins with similar bloom levels have been used as model food to investigate the mechanisms underlying the destructuring of food during mastication (Hennequin, Allison, Veyrune, Faye, & Peyron, 2005). To obtain dry (D) and wet (W) conditions, the water content of gelatin powders was equilibrated by placing them for 10 days at 18 °C in the dark in sealed containers containing either air humidified with a volume of water greater than the quantity of powder (W) or excess dehydrated silica gel (D). Powders with water contents of 0.06 and 0.34 kg_{water}/kg_{DM} were obtained for the B125 gelatin and 0.06 and 0.42 kg_{water}/kg_{DM} for the B200 gelatin. The water contents measured at each stage of the experimental protocol are shown in Fig. 1 and Table 2. Gels were prepared with these powders supplemented with 1 M Tris buffer (2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol; Trizma® Pre-set crystals, Sigma Aldrich, France) to maintain the pH of the glycation reaction at 9 ± 0.5. pH was measured with an Inlab 427 probe and a MA235 pH-meter (Mettler Toledo, France) that had been previously calibrated. The glycation reaction was initiated (outside the "Control" conditions) by the addition of *D*-ribose at 0.03 kg_{water}/kg_{DM} (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Based on the amount of buffer added and the fraction of water contained in the gelatin and the *D*-ribose powders (added at 7 wt% for the "Glycated - G" conditions), the gels obtained for each Bloom index had a water content of 2.68 ± 0.04 kg_{water}/kg_{DM} for the D-condition and 3.74 ± 0.11 kg_{water}/kg_{DM} for the W-condition. The whole mixture was placed on a rotary shaker (Tube Revolver, Thermo Scientific, Germany) in an oven regulated at 50 °C (Binder KB115, MC2, France) until the gelatin was dissolved and homogenized. After 3 h of agitation, the gels were poured into either 20 mm-diameter, 10 mm-high stainless-steel cylindrical molds cooled with ice for texture profile

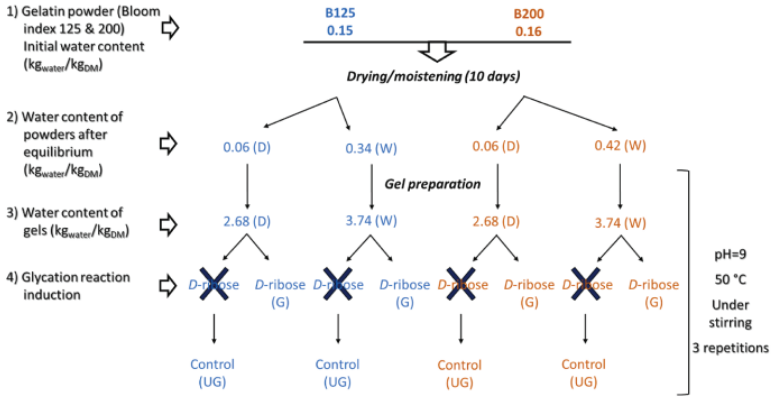


Fig. 1. Experimental design devised for this study.

Table 2
Hydration values of gelatins and gelatin gels as a function of experimental protocol stages.

Experimental stage	Water content B125 (kg_{water}/kg_{DM})	Water content B200 (kg_{water}/kg_{DM})
Native gelatin (powder)	0.15	0.16
After drying conditions (10 days)	0.06	0.06
After hydration conditions (10 days)	0.34	0.42
After gelation	2.68 ± 0.04 (dried gelatin) 3.74 ± 0.11 (wet gelatin)	2.68 ± 0.04 (dried gelatin) 3.74 ± 0.11 (wet gelatin)

analysis (TPA) and colorimetric measurements, into 10 mm-diameter, 20 mm-high molds for electron microscopy observations, or into 4 mm-diameter 10 mm-high molds for LC-MS/MS analysis. After leaving to set for 15 min on an ice bed, the samples were placed in airtight containers at 4 °C. For the rheological measurements, the gels were poured into 38 × 1 mm cylindrical molds. As the molds were so thin, the gels were poured at room temperature, covered with a glass plate to ensure a homogeneous thickness, and then placed at 4 °C. The "Control" mixtures were prepared in the same way but with no added D-ribose, and each mixture was made in triplicate, giving 3 unglycated (UG) control gels and 3 glycated (G) gels simultaneously prepared.

2.2. Color measurements

Color was recorded using a spectrophotometer CM 2500 d (Konica Minolta, Japan) in the CIELAB system (D65-10°-L*a*b*-d/8-SCE). The instrument was calibrated at 0 (in the air) and with a reference white (No. 7009694). Color measurements were performed on 10 mm-thick gels placed on a sheet of white paper. Total color difference (ΔE*) values were calculated with reference to the control (UG - without D-Ribose), as:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{(Eq. 1)}$$

where a* is red index, b* is yellow index, L* is luminance, and ΔE* is total color difference in the CIELAB system.

2.3. Investigation of the glycation reaction by LC-MS/MS

Gelatin gels were enzymatically hydrolyzed for LC-MS/MS analysis. Based on previous experiment, trypsin was used to hydrolyze the samples because of the greater number of peptides obtained compared with chymotrypsin and type-1 collagenase (data not shown). Gel cylinders (4 × 10 mm) were cut into small pieces and placed for 21 h at 37 °C with agitation, in a rotary shaker (60 rpm), in 400 µL of 25 mM ammonium bicarbonate buffer containing 2 mg trypsin (1/100 w/w). After enzymatic digestion, peptides were separated from undigested residual proteins by ultrafiltration (for 2 h at 10,000 g at room temperature) on a Vivaspin 500 column (5000 Da MWCO, Sartorius, Germany). The peptide purification and concentration steps were performed using a Peptide Cleanup C18 Spin tubes column (Agilent, California, USA) per the manufacturer's recommendations. First, 50 µL of filtered solution was deposited on the column, and then the peptides retained on the C18 chromatographic column were then eluted with an aqueous solution containing 70% acetonitrile (v/v). The resulting peptide hydrolysate was then analyzed by NanoLC-MS/MS mass spectrometry Orbitrap-HFX (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Identifications of peptides and glycation modifications were performed with PeaksX-PRO software (Bioinformatics Solutions Inc., Canada) using the *suscrofa* library (49792 seq, uniprot) as protein sequence library. As this was an exploratory approach, only gelatin B200 was analyzed here.

2.4. Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy

Rectangular pieces of gels (10 × 3 × 3 mm) were cut from cylinders (10 × 20 mm) and immersed in a solution composed of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4, kept at 4 °C for at least 24 h

Table 3
Nomenclature of the experimental conditions used.

Gelatin	Abbreviation	Humidity conditions	Abbreviation	Glycation conditions	Abbreviation
Bloom index 125	B125	Dry (2.68 kg_{water}/kg_{DM})	D	Unglycated (no D-ribose)	UG
Bloom index 200	B200	Wet (3.74 kg_{water}/kg_{DM})	W	Glycated (with D-ribose)	G

at ambient temperature, and then stored at 4 °C until use. Samples were cut into small pieces of about 1 mm^3 that were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h and then dehydrated by successive baths in a graded series of ethanol and propylene oxide solutions before being embedded in epoxy resin (TAAB, Eurobio, France) (Theron et al., 2011). Ultra-thin sections (90 nm; Ultracut E, Reichert-Jung, UK) were stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963), then observed by transmission electron microscopy (Hitachi H7650, Japan) with an accelerating voltage of 80 kV at 2500, 8000 and 70000 magnifications. A total of 150 images were acquired using a digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan).

2.5. Textural properties

The Texture Profile Analysis (TPA) test was used to determine the following parameters: hardness, adhesiveness, cohesiveness, springiness, and chewiness. Measurements were performed on an EZ-Test LX texturometer (Shimadzu, France) under the following conditions: 20 × 10 mm cylindrical gel sample, 50 mm-diameter compression probe, surface detection at 0.5 N, displacement speed of 20 mm/min, and double compression at 50% of the sample height. The gel samples were placed at room temperature 2 h before the measurements.

2.6. Rheological properties

The rheological behavior of the gels was determined with a HAAKE MARS iQ Air rheometer (Thermo Electron GmbH, Germany) fitted with a 35-mm-diameter striated plane–plane geometry with a gap of 1 mm. The temperature of the samples was regulated at 20 °C ± 1 °C. A stress sweep was performed at a frequency of 1 Hz, and the following values were recorded: 1) shear stress at the intersection of the viscoelastic moduli G′ and G″, named 'τ-crossing' here, which informs on the ability to delay irreversible deformation of the gel network and on the degree of crosslinking of the matrix, 2) G′ max, which informs on the strain energy retained in the system and characterizes the elastic part of the sample (reversible deformation property), and 3) 'τ-end-LVR', which informs on the degree of structuring of the gels (Castellani, Poulesquen, Goettmann, Marchal, & Choplin, 2013; Simoes, Miranda, Cardoso, & Vitorino, 2020).

The B125 and B200 gelatins behave differently, in particular due to adhesion defects with the striated geometry of the rheometer in the case of the B200. In order to determine the end of the linear viscoelastic region (τ-end-LVR) and the value of the shear stress (τ) at this point, which corresponds to a 10% decrease in the value of the elastic modulus G′, we had to code an internal script in Matlab® R2019b (MathWorks, Massachusetts, USA) as the built-in machine algorithm did not work properly in some cases (RheoWin™, Karlsruhe, Germany). In order to eliminate initial variations within the domain for τ over 500 Pa, the point of lowest gradient was defined as within the flat portion. Points of lower τ were then added to what was considered the first part of the flat portion while the absolute difference between their G′ value and the adjacent point remained under 10%. Under this criterion, the point of lowest τ defined the start of the useful portion of the curve and the flat portion. Within this useful portion, points of higher τ were incrementally added while the average value of G′ remained under within 10% of the previous average. Finally, and in order to compensate for the data-points interval, the value of τ for a drop of 10% was estimated through linear interpolation between the last point before the limit and the first point exceeding it.

2.7. Statistical analysis

Data was analyzed by Grubbs test to detect outliers and by one-way analysis of variance (ANOVA) using Statistica 14.0.0.15 (Tibco Software Inc., California, USA). Tukey's test was used for *post-hoc* multiple comparisons with the level of significance set at $P < 0.05$. Results were expressed as means ± standard error of the mean (SEM).

3. Results and discussion

3.1. Color changes

The results of the colorimetry measurements are reported in Table 4. Only the yellow index (b*) was dependent on the Bloom index of the gelatins. This can be explained by the fact that the yellow color of gelatin powders can vary from batch to batch depending on the manufacturing process. Glycation reduced the luminance (L*) of dry samples (D) but not wet samples (W). After glycation, the red (a*) and yellow (b*) indices increased significantly for the W and D samples, leading to an almost 3-fold higher ΔE* for D samples than W samples. The calculated ΔE* values (Eq. (1)) were greater than 11.0. According to Hernandez Saluena, Saenz Gamasa, Dineiro Rubial, and Alberdi Odriozola (2019), a $\Delta E^* \geq 2$ is perceptible to the human eye. In line with Etxabide et al. (2017), the glycated samples (G) presented a significantly darker color than the unglycated samples (UG), thus evidencing that the glycation reaction had effectively taken place in the presence of *D*-ribose.

These results agree with the literature indicating that gelatin color darkens with temperature. Stevenson et al. (2020) showed that this color darkening was independent of gelatin concentration and was associated with an increase in gel cross-linking that could be a consequence of glycation (Stevenson et al., 2020). Etxabide et al. (2021) attributed the decrease in L* in carbohydrate-enriched gelatin to light absorption by reaction intermediates (*e.g.* 1-deoxyribosone and 3-deoxyribosone), and by the melanoidins produced in the later stages of the reaction (Zhan et al., 2020). Only the L* values obtained from dry gelatin (D) samples decreased significantly (black shift) whereas the wet gelatin samples (W) showed no change in L* (Table 4). This could mean a lower presence of reaction intermediates and/or melanoidins in the W-condition. Therefore, the initial water content of the gelatin powder influences the colorimetric properties of the gel and has an impact on the glycation reaction.

3.2. Investigation of the glycation reaction by LC-MS/MS

Three proteins were identified.

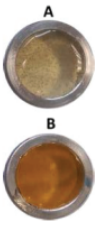
1) Collagen type I, alpha 1 chain (Gene name: COL1A1)
2) Collagen type I, alpha 2 chain (Gene name: COL1A2)
3) Collagen alpha-1(III) chain preprotein (Gene name: COL3A1)

The alpha 1 chain of type I collagen is the major protein found primarily in connective tissues such as animal skin. Sequence analysis identified the formation of cross-links between *D*-ribose and amino acids. Fig. 2 shows that *D*-ribose preferentially binds to Serine and Threonine residues of type I collagen in gelatin gel (B200). In this case, it is *O*-glycation, *i.e.* the reaction takes place on a hydroxyl group (Sun et al., 2021). The *N*-glycation reaction (on an amine group) is more commonly described in the literature. It occurs notably on Lysines and Arginines and forms Schiff-bases. Although these are preliminary results, it appears that:

1) Cross-links form between *D*-ribose and the Serine and Threonine residues (Fig. 2), and thus the interactions taking place mainly on hydroxyl groups (*O*-glycation), as shown on albumin and dextran by Sun et al. (2021);
2) Serine and Threonine residues are still available when the reaction is initiated (*O*-glycation). This would not be the case for Lysine and Arginine, which may have been mobilized in covalent glycation bonds during the extraction process. These bonds may involve residual carbohydrates other than *D*-ribose, or oxidized lipids present in gelatin (Duconseille, Gaillard, Santé-Lhoutellier, & Astruc, 2018; Zamora & Hidalgo, 2005);

Table 4
Color measurements on gels prepared with gelatins at different Bloom index (B) and initial water content values. To illustrate, image A corresponds to a B125 gel without D-ribose (Unglycated - UG) and image B corresponds to the same B125 gel with D-ribose (Glycated - G). Two means (±SEM) values followed by the same letter are not significantly different using Tukey's multiple range test ($P > 0.05$). Comparisons are made within same-color columns.

	D-ribose	L*	a*	b*	ΔE*
B125 UG *(n=18)*	No	54.4± 0.7^{a}	-0.3±0.2^{a}	24.1±0.8^{a}	/
B200 UG *(n=18)*		54.7±0.7^{a}	-0.8±0.1^{a}	20.8±0.9^{b}	/
B125 G *(n=18)*	Yes	48.8±1.2^{b}	13.7±1.5^{b}	40.9±2.1^{c}	22.5
B200 G *(n=18)*		49.0±1.1^{b}	13.8±1.6^{b}	40.2±2.3^{c}	24.9
B125 D G *(n=9)*	Yes	44.5± 0.6^{c}	19.6± 0.3^{c}	48.9±1.1^{d}	33.3
B125 W G *(n=9)*		53.1± 0.9^{a}	7.8±0.6^{d}	32.8±1.0^{e}	11.9
B200 D G *(n=9)*		44.8± 0.4^{c}	20.1±0.2^{c}	49.5±0.2^{d}	36.8
B200 W G *(n=9)*		53.2± 0.7^{a}	7.5±0.6^{d}	30.9±0.7^{e}	13.2



[1]MFSFVDLRLL LLLAATALLT HGQEEGQEEG QQGQEEDIPP VTCVQNGLRY HDRDVWKPVP CQICVCDNGN VLCDDVICDE IKNCPSARVP AGECCPVCPE
GEVSPTDQET TGVEGPKGDT GPRGPRGPSG PPGRDGIPGQ PGLPGPPGPP GPPGPPGLGG NFAPQLSYGY DEKSAGISVP GPMGPSGPRG LPGPPGAPGP
QGFQGPPGEP GEPGASGPMG PRGPPGPPGK NGDDGEAGKP GRPGERGPPG PQGARGLPGT AGLPGMKGHR GFSGLDGAKG DAGPAGPKGE PGSPGENGAP
GQMGPRGLPG ERGRPGPPGP AGARGNDGAT GAAGPPGPTG PAGPPGFPGA VGAKGEAGPQ GARGSEGPQG VRGEPGPPGP AGAAGPAGNP GADGQPGGKG
ANGAPGIAGA PGFPGARGPS GPQGPSGPPG PKGNSGEPGA PGSKGDTGAK GEPGPTGVQG PPGPAGEEGK RGARGEPGPA GLPGPPGERG GPGSRGFPGA
DGVAGPKGPA GERGSPGPAG PKGSPGEAGR PGEAGLPGAK GLTGSPGSPG PDGKTGPPGP AGQDGRPGPP GPPGARGQAG VMGFPGPKGA AGEPGKAGER
GVPGPPGAVG PAGKDGEAGA QGPPGPAGPA GERGEQGPAG SPGFQGLPGP AGPPGEAGKP GEQGVPGDLG APGPSGARGE RGFPGERGVQ GPPGPAGPRG
ANGAPGNDGA KGDAGAPGAP GSQGAPGLQG MPGERGAAGL PGPKGDRGDA GPKGADGAPG KDGVRGLTGP IGPPGPAGAP GDKGETGPSG PAGPTGARGA
PGDRGEPGPP GPAGFAGPPG ADGQPGAKGE PGDAGAKGDA GPPGPAGPTG PPGPIGSVGA PGPKGARGSA GPPGATGFPG AAGRVGPPGP SGNAGPPGPP
GPAGKEGSKG PRGETGPAGR PGEAGPPGPP GPAGEKGSPG ADGPAGAPGT PGPQGIAGQR GVVGLPGQRG ERGFPGLPGP SGEPGKQGPS GPSGERGPPG
PMGPPGLAGP PGESGREGAP GAEGSPGRDG APGPKGDRGE SGPAGPPGAP GAPGAPGPVG PAGKSGDRGE TGPAGPAGPV GPVGARGPAG PQGPRGDKGE
TGEQGDRGIK GHRGFSGLQG PPGPPGSPGE QGPSGASGPA GPRGPPGSAG APGKDGLNGL PGPIGPPGPR GRTGDAGPVG PPGPPGPPGP PGPPSGGFDF
SFLPQPPQEK AHDGGRYYRA DDANVVRDRD LEVDTTLKSL SQQIENIRSP EGSRKNPART CRDLKMCHSD WKSGEYWIDP NQGCNLDAIK VFCNMETGET
CVYPTQPSVP QKNWYISKNP KDKRHVWYGE SMTDGFQFEY GGEGSDPADV AIQLTFLRLM STEASQNITY HCKNSVAYMD QQTGNLKKAL LLQGSNEIEI
RAEGNSRFTY SVIYDGCTSH TGAWGKTVIE YKTTKTSRLP IIDVAPLDVG APDQEFGIDL SPVCFL[1466]

Fig. 2. Proteomic map corresponding to a gelatin gel with a Bloom index of 200 prepared from powdered gelatin. Amino acids that reacted with D-ribose to form a cross-link are colored in blue.

3) Glycation at the level of Lysine and Arginine is not observed because trypsin would only weakly hydrolyze glycated gelatin. Only the reactions on the amino acids considered as secondary for glycation, Serine and Threonine, are highlighted.

3.3. Microstructural characterization

Images a, b, d, and e in Fig. 3 correspond to the D-ribose-free control conditions (UG) and reveal a noticeable difference in the ultrastructure of the gels as a function of their Bloom index (B125 *vs.* B200). For these UG samples, whether in initial condition D (Dry: 2.68 kg_{water}/kg_{DM}, Fig. 3a, b, c) or W (Wet: 3.74 kg_{water}/kg_{DM}, Fig. 3d, e, f), the ultrastructure of the gel is homogeneous for B125 (Fig. 3a, d) but more heterogeneous having the appearance of a network or mesh for B200 (Fig. 3b, c, e, f). Etxabide, Urdanpilleta, Guerrero, and de la Caba (2015) made similar observations by atomic force microscopy (at identical magnifications) on fish gelatin gels. They suggested that these heterogeneous structures, which they term "fibrillar", corresponded to the triple helix structures present in gelatin. We posit that the heterogeneous structures observed here in B200 gelatin could also be attributed to triple helices, or bundles of triple helices (also named aggregates), and could be related to: 1) the molecular weight (longer protein chain), Kuai et al. (2020) showed that gels with high Bloom index values had more triple helix structures and entangled high-molecular-weight protein chains and, 2) to the process used to extract gelatin from pig skins (Cheng, Wang, Zhang, Zhai, & Hou, 2021; Netter et al., 2020). Nevertheless, in the case of gelatin B200, we posit that the aggregates observed in the absence of D-ribose (UG) may result from the pH of the reaction, here set at 9, will promote glycation but also modify the overall charge of the gelatin (7 < isoelectric point <9 for a type-A gelatin). The gelatin will be negatively charged, and so electrostatic interactions between neighboring molecules will promote helix formation (Pulidori

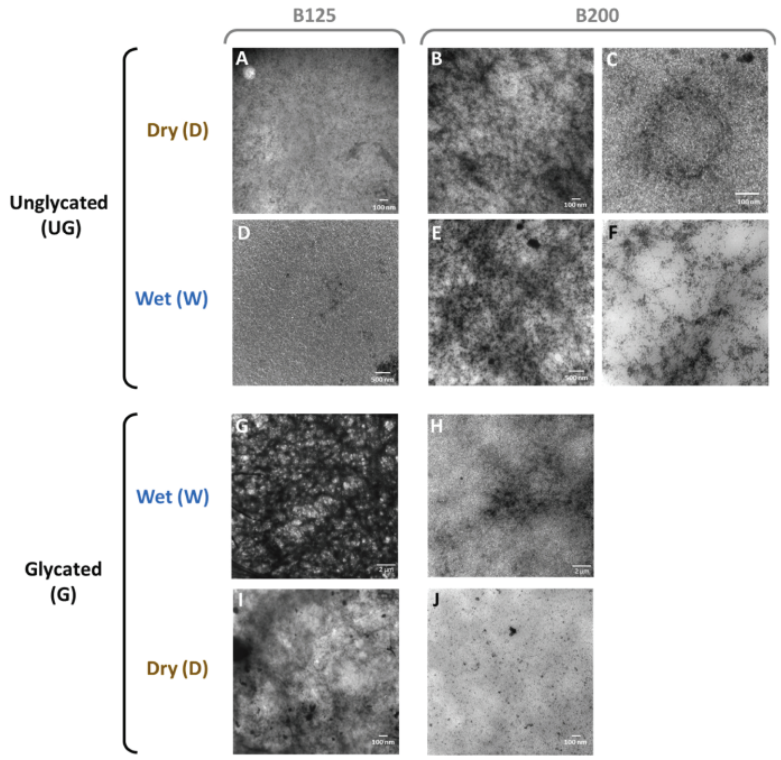


Fig. 3. Transmission electron microscopy observations on gelatin gels with different Bloom index values (B125 and B200) and different initial water contents (Dry – D or Wet – W), and in presence or absence of *D*-ribose (Glycated – G or Unglycated – UG). A: B125DUG; B: B200DUG; C: B200DUG; D: B125WUG; E: B200WUG; F: B200WUG; G: B125WG; H: B125DG; I: B200DG; J: B200WG.

et al., 2023). As a high Bloom index (200 *vs.* 125) means the presence of longer protein chains and thus potentially more electrostatic interactions, it would favor the formation of aggregates, including under UG-condition. This limits the possible interactions between gelatin and the added compounds. They showed that the addition of a molecule influenced the structure of the gel. Indeed, the hydroxyl and amine groups of polyphenol molecules and chitosan (polyoside)-loaded nanoparticles can form hydrogen bonds with the gelatin chains and thus interfere with a triple helix structure. This was confirmed by Alouffi et al. (2022) who showed that *D*-ribose binding altered the structure of proteins (fibrinogen). In our case, regardless of the initial water content of the gelatin, the amount of aggregates observed was lower in the G-condition (Glycated) (Fig. 3h, j) than in the UG-condition (UnGlycated) (Fig. 3b, e) for a Bloom index of 200.

The B125 WG gelatin showed a highly visible set of aggregates that looked like a network (Fig. 3g), in contrast to the D-condition (Fig. 3i) and B200 gelatin, regardless of its water content (Fig. 3h, j). The aggregates present in Fig. 3e (B200WUG) were also present, at higher magnification, without *D*-ribose (Fig. 3h, B200WG). Before glycation, the B125 WUG gelatin (Fig. 3, d) had a homogeneous structure. Glycation thus appeared to drive strong modification in the ultrastructure of the wet B125 gels but less strongly modify the same-Bloom-index gelatin in dry conditions (B125DG).

These results show that, in the present conditions and for B125 gelatins, the *D*-ribose leads to the formation of aggregates only in gelatins with high humidity content (3.74 kg_{water}/kg_{DM}). Thus, humidity and Bloom index have an impact on the glycation reaction. We suggest that *D*-ribose is responsible for the formation of intermolecular bonds during the glycation reaction in B125 gels, leading to the formation of aggregates, as previously observed on fish gelatin glycated with lactose (Etxabide et al., 2015). Here the aggregates observed after glycation in B125W would be of a different structure than those observed before glycation in B200 which were potentially bundles of triple helices.

In the tested conditions, the reactive sites seem to be more accessible in B125W gels, as they experience less steric hindrance compared to B200 gels.

3.4. Textural properties

The texture analysis results, reported in Table 5, provide insights into the effect on texture of Bloom index (B125 or B200), initial water content of the gelatin (D or W), and of the addition or not of *D*-ribose (G or UG). Table 5 shows that hardness, cohesiveness and chewiness values increased significantly with the higher Bloom index, which aligns with the literature (Civille & Szczesniak, 1973; Bigi, Panzavolta, & Rubini, 2004). The hardness and chewiness values were significantly higher for the B200 gels compared to the B125 gels, indicating higher mechanical and deformation resistance. A high Bloom index and low initial water content and the presence of *D*-ribose significantly improved the cohesion of the sample. Gels obtained from W gelatin showed significantly lower hardness, cohesiveness, and chewiness than gels obtained from D gelatin. The increase in water intake in gels may have influenced the molecular mobility in gelatin with higher water content (Duconseille et al., 2017). We observed that UG gels had significantly higher hardness and chewiness values than G gels, indicating that glycation would tend to decrease the mechanical strength of gels. Similar findings have already been reported on egg-white gels glycated with ribose (Yang et al., 2021) where the reducing action of ribose was believed to affect

Table 5
Average values (n = 18) of 5 texture parameters of gelatin gels based on a TPA test as a function of Bloom index (B125 *vs.* B200), initial water content (Dry *vs.* Wet), and presence or absence of *D*-ribose (Glycated *vs.* Unglycated). Two means (±SEM) followed by the same letter are not significantly different using Tukey's multiple range test ($P > 0.05$). Comparisons are made two by two within same-color rows.

	Hardness (N)	Adhesiveness	Cohesiveness	Springiness	Chewiness (N)
B125	43.28±2.23^{a}	-0.16±0.01	0.89±0.00^{a}	0.98±0.00	37.99±2.07^{a}
B200	56.11±2.25^{b}	-0.16±0.01	0.91±0.00^{b}	0.98±0.00	49.67±1.89^{b}
Dry	62.29±1.47^{c}	-0.17±0.01	0.90±0.00^{c}	0.98±0.00	55.08±1.21^{c}
Wet	37.63±1.20^{d}	-0.15±0.01	0.89±0.00^{d}	0.98±0.00	33.05±1.15^{d}
Glycated	45.84±2.24^{e}	-0.15±0.01	0.91±0.00^{e}	0.98±0.00	40.69±2.04^{e}
Unglycated	53.84±2.54^{f}	-0.17±0.01	0.89±0.00^{f}	0.98±0.00	47.22±2.24^{f}

the disulfide bonds within the egg-white gel. While this explanation may not fully apply to gelatin as it contains few sulfur amino acids capable of forming this type of bond (Table 1), the significantly higher cohesiveness values for G gels show that they can deform more before rupture.

The gelatin triple helices were probably partially denatured due to the reaction temperature (50 °C). Interactions between *D*-ribose and protein chains would maintain the denatured structures after cooling, resulting in a decrease in hardness. These structural modifications could be attributed to a reduced number of hydrogen bonds present between the partially-denatured triple helices.

3.5. Rheological properties

For all the conditions studied, the storage modulus (G′) values were systematically higher than the loss modulus (G″) values (Fig. 4), which confirms that the gels studied behave like viscoelastic solids.

Table 6a, b, c compare the average values of the τ-crossing, G′ max and τ-end-LVR rheological parameters determined from the curves of Fig. 4. These parameters were significantly higher for B200 gel compared to B125 gel and for condition D compared to condition W. This is consistent with Bigi et al. (2004) which showed a linear relationship between Bloom's index and the quantity of triple helices. Table 6a also shows that G′ max was the only parameter that differentiated the different conditions tested.

The τ-end-LVR measurements performed suggest that low water content and high Bloom index (B200D) provide better resistance of deformation of gels. This was not the case in the glycated (G) condition (Table 6a). However, in the WG-condition, the value of τ-end-LVR was significantly higher than in WUG (Table 6b). This is the only case in this study where the gel resisted longer to the deformation, in the G-condition. This might be the result of the presence of water in the gelatin which favors the mobility of the protein chains and the unwinding of the triple helices (Duconseille et al., 2017; Levine & Slade, 1988). This can be promoting glycation and the formation of cross-links between gelatin chains, increasing overall resistance of the gel. In this particular case (B200WG), the *D*-ribose could have facilitated access to the reactive sites and thus the establishment of covalent bonds.

The addition of *D*-ribose significantly decreased the G′ max value, regardless of water content (Table 6b). Regardless of Bloom index, D-condition gelatin gels withstood greater deformation than W-condition gelatin gels. Indeed, for the three parameters measured (τ-crossing, G' max and τ -end-LVR, see section 2.6), D-condition values were almost two-fold higher than W-condition values. Indeed, Fig. 4a confirms that B125 gelatin showed a significantly different behavior, with higher elasticity (G′) values, higher viscous modulus (G″) values, and a shorter linear viscoelastic region (LVR) for the D-condition as a function of applied stress, in both the presence and absence of *D*-ribose.

According to Joly-Duhamel, Hellio, Ajdari, and Djabourov (2002), G′ modulus correlates to number of triple helices, regardless of temperature: higher G′ values equate to a higher number of triple helix structures. The number of triple helices is also directly correlated with Bloom index (Bigi et al., 2004). In the present results, G′ max of gelatins B125 G and UG was significantly lower that gelatins B200 G and UG (Table 6c). This is consistent with the literature since B200 have more triple-helices than B125. Therefore, Bloom index appears to be a major parameter influencing G′ max in particular due to the elastic nature of the gel and its capacity for reversible deformation. G′ max However, as glycation is supposed to strengthen the structure of matrices through covalent bonds (Li et al., 2022; Nooshkam et al., 2020), the results found here for the G- and UG-conditions were not expected. Zhao et al. (2016) also reported a decrease in storage modulus G′ in gels containing soy protein isolate glycated with glucose and maltose, suggesting that glycation tends to weaken the gel structure. They attributed this result to the surrounding carbohydrates that prevent protein denaturation and thus stop the glycation reaction occurring, especially at high temperature. This phenomenon, called "crowding", which increases the thermostability and pH stability of proteins, was also reported by Wang et al. (2021). Kuznetsova, Turoverov, and Uversky (2014) argued that this macromolecular crowding affects protein structure, folding and interactions with other proteins or macromolecules at varying carbohydrate concentrations. Based on the results of Joly-Duhamel et al. (2002), the results of Table 6a, b reveal that the quantity of triple helices would potentially be greater in D- and UG-conditions because the G' max values are high. These results are in line with the TEM observations that show that the density of the aggregates was equivalent or even higher in the DUG-condition compared to WUG (Fig. 3c, f). These aggregates may result from the presence of hydrogen bonds between the triple helices, forming bundle of triple-helices, especially as these bonds help to stabilize the inter-helix areas (Michon, Cuvelier, Relkin & Launay, 1997; Joly-Duhamel et al., 2002; Mao et al., 2022).

The higher G' max values in the UG-condition could also reflect a better ability of gels not containing *D*-ribose to reform a denser network upon cooling. Indeed, Abuibaid, AlSenaani, Hamed, Kittiphattanabawon, and Maqsood (2020) worked with a similar temperature cooldown (from 40 °C down to 5 °C) to here (from 50 °C down to 4 °C) and found that a high G′ reflected an increased ability of the gel to fold into triple helices during the cooling phases. One possible explanation is that the presence of *D*-ribose may disturb the reformation of the triple helices and limit their stabilization through hydrogen bonds. *D*-ribose could form hydrogen bonds with the gelatin chains, interfering with their inter-chain bonding and hinder the refolding into triple helix structures (Wang et al., 2021). As a result, the strength of the gels decreases and random coil structures could predominate. Mao et al. (2022) suggest that the random coils in the gel can spontaneously rearrange into triple helices during cooling. However, Duconseille et al. (2017) also showed that gelatin aging can disrupt this structure by forming crosslinks that

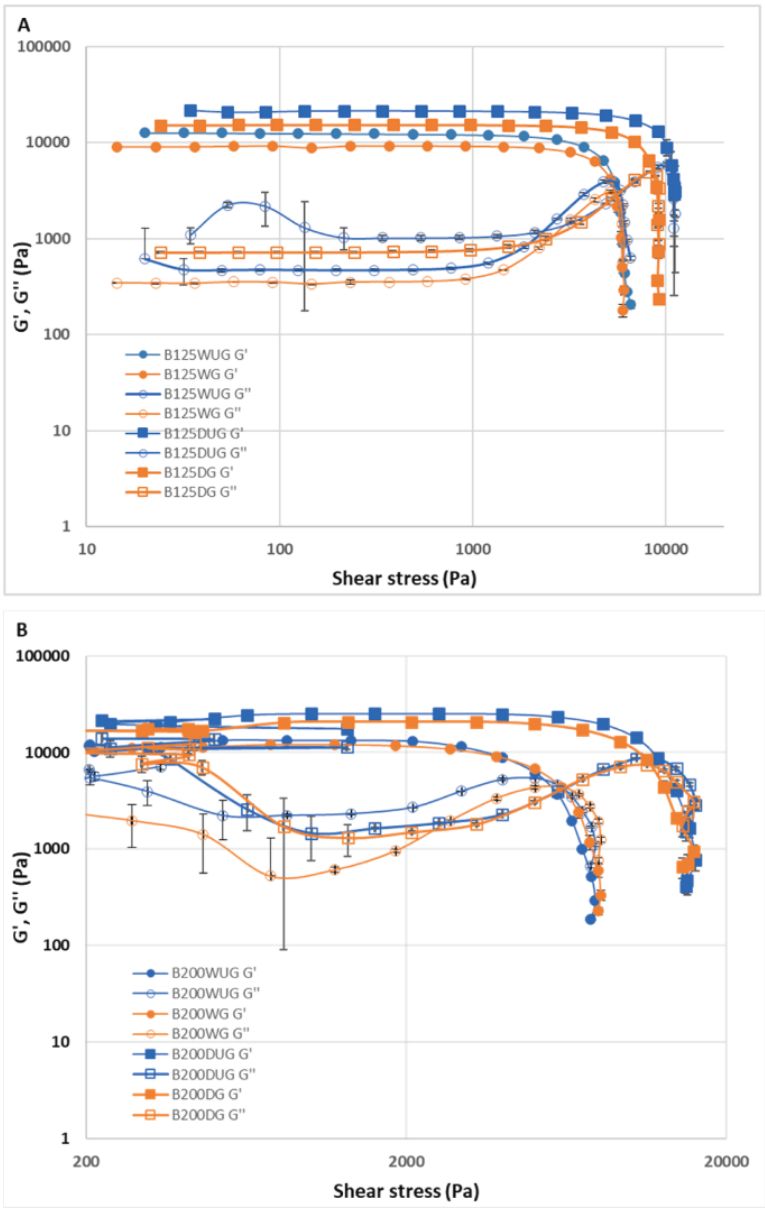


Fig. 4. Average curves of storage modulus (G′) and loss modulus (G″). A - Mean G′ and G″ curves for conditions B125W and B125D. B - Mean G′ and G″ curves for conditions B200W and B200D. Calculated from 3 repetitions. Error bars correspond to the SEM.

prevent the reformation of triple helices. According to Gonzalez and Wess (2013), hydrogen bonds form with any available polar amino acid side chain, including the charged groups of the side chains of amino acids such as Lysine, Arginine, Glutamate and Aspartate residues, and the hydroxyl groups of the side chains of Serine, Threonine and Hydroxylysine. Lysine and Arginine are the main amino acids involved in the glycation reaction, and Serine and Threonine (see 3.2) are likely to form hydrogen bonds. It is therefore possible that a gel with a high Bloom index (high steric hindrance) and, the potential presence of a larger fraction of random coil, may not favor the formation of hydrogen bonds unless the initial water content is high (B200W here). Another recent study also highlighted that water molecules are involved in the formation of hydrogen bonds within a gelatin network (Rather et al., 2022).

In summary, analysis of the rheological properties of gels shows that a Bloom index of 200 induces a better resistance to deformation of gels compared with a Bloom of 125. This resistance increases if the gelatin has a low water content. This is attributed to a greater number of triple helices under these conditions. The glycation reaction leads to a decrease in the gels' resistance to deformation, which could be

Table 6a
Effect of Bloom index (B125 vs. B200), initial water content (Dry vs. Wet) and D-ribose addition (Glycation vs. Unglycated) on rheological parameters of gelatin gels. Two means (n = 18) (±SEM) followed by the same letter are not significantly different using Tukey's multiple range test ($P > 0.05$). Comparisons are made two-by-two, within same-color rows. τ-Crossing corresponds to the values of shear stress at the crossing of the viscoelastic moduli G′ and G″, G′ max corresponds to the value of the storage modulus in the linear viscoelastic region, and τ-end-LVR corresponds to the shear stress at the end of linear viscoelastic region.

	τ-crossing (Pa)	G' max (Pa)	τ-end-LVR (Pa)
B125	7110±337[a]	13913±676[a]	3599±197[a]
B200	8781±567[b]	17532±915[b]	4635±331[b]
Dry (D)	10407±359[a]	20023±622[a]	5509±226[a]
Wet (W)	5576±130[b]	11593±294[b]	2777±87[b]
Glycated (G)	7915±477[a]	14097±740[a]	4159±277[a]
Unglycated (UG)	8001±504[a]	17447±886[b]	4088±298[a]

Table 6b
Effects of D-ribose addition on rheological parameters of gelatin gels as a function of initial gelatin water content. Two means (n = 18) (±SEM) followed by the same letter are not significantly different using Tukey's multiple range test ($P > 0.05$). Comparisons are made two-by-two, within same-color rows. τ-Crossing corresponds to the values of shear stress at the crossing of the viscoelastic moduli G′ and G″, G′ max corresponds to the value of the storage modulus in the linear viscoelastic region, and τ-end-LVR corresponds to the shear stress at the end of linear viscoelastic region.

		τ-crossing (Pa)	G' max (Pa)	τ-end-LVR (Pa)
Dry (D)	**G**	10093±544[a]	17796±686[a]	5363±341[a]
	UG	10741±468[a]	22380±699[b]	5664±301[a]
Wet (W)	**G**	5738±239[a]	10397±330[a]	2954±145[a]
	UG	5413±100[a]	12788±282[b]	2600±82[b]

Table 6c
Effects of D-ribose addition on rheological parameters of gelatin gels as a function of the Bloom index of gelatin. Two means (n = 18) (±SEM) followed by the same letter are not significantly different using Tukey's multiple range test ($P > 0.05$). Comparisons are made two-by-two, within same-color rows. τ-Crossing corresponds to the values of shear stress at the crossing of the viscoelastic moduli G′ and G″, G′ max corresponds to the value of the storage modulus in the linear viscoelastic region, and τ-end-LVR corresponds to the shear stress at the end of linear viscoelastic region.

		τ-crossing (Pa)	G' max (Pa)	τ-end-LVR (Pa)
B125	**G**	6981±462[a]	12131±754[a]	3741±272[a]
	UG	7246±505[a]	15800±961[b]	3448±289[a]
B200	**G**	8849±771[a]	16062±1080[a]	4577±462[a]
	UG	8713±853[a]	19002±1424[a]	4693±486[a]

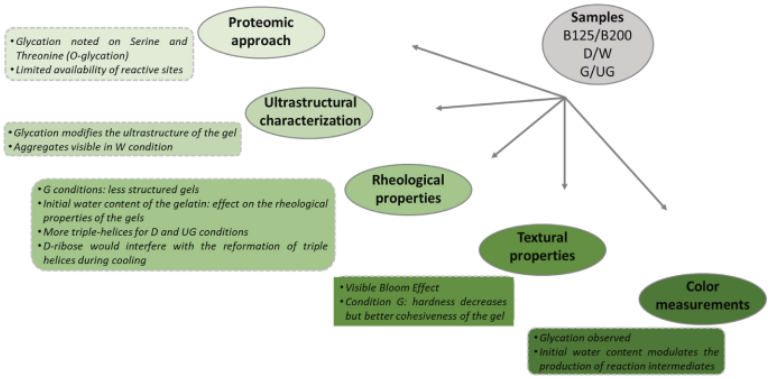


Fig. 5. Synthesis of the main results obtained according to the methods used. The experimental conditions depended on the Bloom index of the gelatins (B125 or B200), the initial water content of the gelatin powders (Dry – D or Wet – W), and the presence or absence of D-ribose (Glycated – G or Unglycated – UG).

explained by the fact that D-ribose disrupts the reformation of triple helices during cooling. A high-water content would favor D-ribose access to amino acids. Storage modulus is the only parameter that differentiates the conditions tested.

Fig. 5 summarizes the main results obtained in this study.

4. Conclusion

The mechanisms associated with the glycation reaction in a gelatin gel are complex and sometimes contradictory. In this study, we applied a multidisciplinary approach in an effort to understand the effect of glycation on the main characteristics of gelatin gels. These results confirmed that the glycation reaction took place between the Serine and Threonine residues of gelatin proteins and D-ribose (*O*-glycation), rather than between the Lysine and Arginine residues (*N*-glycation) as is often reported in the literature. The reaction leads to the appearance of colored conjugates, the formation of which is enhanced at low initial gelatin water content. There was a clear effect of the Bloom index of the gelatin on gel ultrastructure, with the B200 gelatin having a higher number of aggregates before glycation, associated with a higher number of bundles of triple helices. This appears to affect glycation by creating high steric hindrance, which limits the ability of D-ribose to access reactive sites. In contrast, gelatins with a lower Bloom index (B125 here) but a high initial water content had fewer aggregates, suggesting a more colloidal structure and a lower number of bundles of triple helices.

The rheological properties of the gels were dependent on the initial water content of the gelatin powders: the number of triple helices was higher at lower water content. The research question set out in section 1 can therefore be answered in the affirmative: changes in the ultrastructure of gelatin, induced by variations in water content, have an effect on the course of the glycation reaction and on the texture of gelatin gels.

Concrete application of the glycation reaction for texturizing gelatin gels is therefore subject to the variability of the raw material, which, in turn, depends on the storage and usage environmental conditions. This study shows the importance of controlling gelatin water content to regulate the glycation reaction when utilizing it for food texturization. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses are underway to complement these initial results and provide deeper insights into the underlying chemical reactions occurring during glycation.

Author statement

Stéphane Portanguen: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft.

Charlotte Dumoulin: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Review & Editing.

Anne Duconseille: Validation, Formal analysis, Writing - Original Draft.

Maïa Meurillon: Validation, Writing - Original Draft.

Jason Sicard: Software, Visualization.

Laëtitia Théron: Methodology, Writing - Review & Editing.

Christophe Chambon: Methodology, Investigation.

Thierry Sayd: Methodology, Investigation.

Pierre-Sylvain Mirade: Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Thierry Astruc: Validation, Supervision, Project administration.

Funding

The authors would like to warmly thank the coordinators of the Emergence programme (call for projects 2019) of the I-SITE CAP2025 project led by the Université Clermont Auvergne for their financial support, which enabled the work presented in this article to begin.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors thank Thomas Brunel, Mona Fortune, Christine Ravel, Claude De Oliveira Ferreira and Raphaël Favier for their technical support, and the "Centre d'Imagerie Cellulaire Santé" - CICS (Clermont Auvergne University) for running the TEM observations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109096.

References

Abuibaid, A., AlSenaani, A., Hamed, F., Kittiphattanabawon, P., & Maqsood, S. (2020). Microstructural, rheological, gel-forming and interfacial properties of camel skin gelatin. *Food Structure, 26*, Article 100156.

Alouffi, S., Khanam, A., Husain, A., Akasha, R., Rabbani, G., & Ahmad, S. (2022). d-ribose-mediated glycation of fibrinogen: Role in the induction of adaptive immune response. *Chemico-Biological Interactions, 367*, Article 110147.

Bigi, A., Panzavolta, S., & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials, 25*(25), 5675–5680.

Birlouez-Aragon, I., Morales, F., Fogliano, V., & Pain, J. P. (2010). The health and technological implications of a better control of neoformed contaminants by the food industry. *Pathologie Biologie, 58*(3), 232–238.

Castellani, R., Poulesquen, A., Goettmann, F., Marchal, P., & Choplin, L. (2013). Ions effects on sol–gel transition and rheological behavior in alumina slurries. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 430*, 39–45.

Cheng, Y., Wang, W., Zhang, R., Zhai, X., & Hou, H. (2021). Effect of gelatin bloom values on the physicochemical properties of starch/gelatin–beeswax composite films fabricated by extrusion blowing. *Food Hydrocolloids, 113*, Article 106466.

Civille, G., & Szczesniak, A. (1973). Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies, 4*, 204–223.

Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., & Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids, 43*, 360–376.

Duconseille, A., Gaillard, C., Santé-Lhoutellier, V., & Astruc, T. (2018). Molecular and structural changes in gelatin evidenced by Raman microspectroscopy. *Food Hydrocolloids, 77*, 777–786.

Duconseille, A., Wien, F., Audonnet, F., Traore, A., Refregiers, M., Astruc, T., et al. (2017). The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. *Food Hydrocolloids, 66*, 378–388.

Etxabide, A., Kilmartin, P. A., Maté, J. I., Prabakar, S., Brimble, M., & Naffa, R. (2021). Analysis of advanced glycation end products in ribose-, glucose- and lactose-crosslinked gelatin to correlate the physical changes induced by Maillard reaction in films. *Food Hydrocolloids, 117*, Article 106736.

Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Gómez-Arriaran, I., de la Caba, K., & Guerrero, P. (2017). Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films. *Reactive and Functional Polymers, 117*, 140–146.

Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2015). Effects of cross-linking in nanostructure and physicochemical properties of fish gelatins for bio-applications. *Reactive and Functional Polymers, 94*, 55–62.

Eysturskarð, J., Haug, I. J., Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Draget, K. I. (2009). Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocolloids, 23*(7), 1702–1711.

Feng, N., Shen, Y., Hu, C., Tan, J., Huang, Z., Wang, C., et al. (2021). Inhibition of advanced glycation end products in yogurt by lotus seedpod oligomeric procyanidin. *Frontiers in Nutrition, 8*, Article 781998.

Godoi, F., Prakash, S., & Bhandari, B. (2016). 3d printing technologies applied for food design: Status and prospects. *Journal of Food Engineering, 179*, 44–54.

Gonzalez, L. G., & Wess, T. J. (2013). The effects of hydration on the collagen and gelatin phases within parchment artefacts. *Heritage Science, 1*(14), 1–8.

Hennequin, M., Allison, P. J., Veyrune, J. L., Faye, M., & Peyron, M. (2005). Clinical evaluation of mastication: Validation of video versus electromyography. *Clinical Nutrition, 24*(2), 314–320.

Hernandez Saluena, B., Saenz Gamasa, C., Dineiro Rubial, J. M., & Alberdi Odriozola, C. (2019). CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat Science, 157*, Article 107889.

Jaisson, S., Desmons, A., Gorisse, L., & Gillery, P. (2017). Protein molecular aging: Which role in physiopathology? *Medical Science, 33*(2), 176–182.

Jiang, H., Zheng, L., Zou, Y., Tong, Z., Han, S., & Wang, S. (2019). 3D food printing: Main components selection by considering rheological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59*(14), 2335–2347.

Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A., & Djabourov, M. (2002). All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir, 18*, 7158–7166.

Kozlov, P. V., & Burdygina, G. I. (1983). The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer Reviews, 24*, 651–666.

Kuai, L., Liu, F., Ma, Y., Goff, H. D., & Zhong, F. (2020). Regulation of nano-encapsulated tea polyphenol release from gelatin films with different Bloom values. *Food Hydrocolloids, 108*, Article 106045.

Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., & Uversky, V. N. (2014). What macromolecular crowding can do to a protein. *International Journal of Molecular Sciences, 15*(12), 23090–23140.

Levine, H., & Slade, L. (1988). Water as a plasticizer: Physico-chemical aspects of low-moisture polymeric systems. In F. Franks (Ed.), *Water science reviews 3. Water dynamics* (pp. 79–185). Cambridge: Cambridge University Press.

Liu, J., Ru, Q., & Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International, 49*(1), 170–183.

Li, Y., Xu, Y., & Xu, X. (2022). Continuous cyclic wet heating glycation to prepare myofibrillar protein-glucose conjugates: A study on the structures, solubility and emulsifying properties. *Food Chemistry, 388*, Article 133035.

Mao, L., Ma, L., Fu, Y., Chen, H., Dai, H., Zhu, H., et al. (2022). Transglutaminase modified type A gelatin gel: The influence of intra-molecular and inter-molecular cross-linking on structure-properties. *Food Chemistry, 395*, Article 133578.

Michon, C., Cuvelier, G., Relkin, P., & Launay, B. (1997). Influence of thermal history on the stability of gelatin gels. *International Journal of Biological Macromolecules, 20*, 259–264.

Netter, A. B., Goudoulas, T. B., & Germann, N. (2020). Effects of Bloom number on phase transition of gelatin determined by means of rheological characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 132*, Article 109813.

Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food Research International, 131*, Article 109003.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P.-S. (2019). Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends in Food Science & Technology, 86*, 188–198.

Pulidori, E., Micalizzi, S., Koutsomarkos, N., Bramanti, E., Tinè, M. R., Vozzi, G., et al. (2023). Analysis of gelatin secondary structure in gelatin/keratin-based biomaterials. *Journal of Molecular Structure, 1279*, Article 134984.

Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2011). Receptor for AGE (RAGE): Signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1243*, 88–102.

Rather, J. A., Akhter, N., Ashraf, Q. S., Mir, S. A., Makroo, H. A., Majid, D., et al. (2022). A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life, 34*, Article 100945.

Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology, 17*, 208–212.

Simoes, A., Miranda, M., Cardoso, C., & Vitorino, F. V. A. (2020). Rheology by design: A regulatory tutorial for analytical method validation. *Pharmaceutics, 12*(9).

Stevenson, M., Long, J., Seyfoddin, A., Guerrero, P., de la Caba, K., & Etxabide, A. (2020). Characterization of ribose-induced crosslinking extension in gelatin films. *Food Hydrocolloids, 99*, Article 105324.

Sun, J., Mu, Y., Liu, T., Jing, H., Obadi, M., Yang, Y., et al. (2021). Evaluation of glycation reaction of ovalbumin with dextran: Glycation sites identification by capillary liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry, 341*(Pt 1), Article 128066.

Theron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Venien, A., Peyrin, F., et al. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck "foie gras". *Meat Science, 89*(4), 377–383.

Wang, Y., Dong, L., Zhang, Y., Wang, J., Wang, J., Pang, W., et al. (2021). Effects of glycated glutenin heat-processing conditions on its digestibility and induced inflammation levels in cells. *Foods, 10*(6), 1365.

Wei, Y., Han, C. S., Zhou, J., Liu, Y., Chen, L., & He, R. Q. (2012). D-ribose in glycation and protein aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta, 1820*(4), 488–494.

Yang, M., Liu, J., Yang, X., Li, S., Li, C., Liu, B., et al. (2021). Effect of glycation degree on the in vitro simulated gastrointestinal digestion: A promising formulation for egg white gel with controlled digestibility. *Food Chemistry, 349*, Article 129096.

Yang, L., Yang, M., Xu, J., Nie, Y., Wu, W., Zhang, T., et al. (2022). Structural and emulsion stabilization comparison of four gelatins from two freshwater and two marine fish skins. *Food Chemistry, 371*, Article 131129.

Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2005). Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45*(1), 49–59.

Zhan, H., Tang, W., Cui, H., Hayat, K., Hussain, S., Tahir, M. U., et al. (2020). Formation kinetics of Maillard reaction intermediates from glycine-ribose system and improving Amadori rearrangement product through controlled thermal reaction and vacuum dehydration. *Food Chemistry, 311*, Article 125877.

Zhao, C.-B., Zhou, L.-Y., Liu, J.-Y., Zhang, Y., Chen, Y., & Wu, F. (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on physicochemical characteristics and rheological properties of soy protein/sugar Maillard reaction products. *Journal of Food Science and Technology, 53*(5), 2342–2351.

Zhou, P., Mulvaney, S. J., & Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska pollock skin gelatin: A comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science, 71*(6), C313–C321.

Annexe V 8.

Chapitre « Duconseille & Portanguen (2023) Presses de l'école des Mines ».

La conception d'aliments fonctionnels par impression 3D, est-ce acceptable de l'accepter ?

Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, nous serons plus de 10 milliards d'êtres humains en 2050 et 2,1 milliards d'entre nous auront plus de 65 ans, 434 millions auront même plus de 80 ans (WHO, 2016). Ce vieillissement de la population va s'accompagner de changements sociétaux, notamment au niveau de l'alimentation. Outre la grande question de savoir si les ressources disponibles le seront en quantité suffisante pour couvrir les besoins d'une population croissante, celle de savoir comment nourrir des personnes âgées ou fragiles, toujours plus nombreuses se pose également. En effet, les pathologies propres à ces tranches d'âges seront surreprésentées et, parmi elles, les problèmes bucco-dentaires. En effet, avec le vieillissement et ses pathologies associées, la perte des dents, l'altération de la coordination des mouvements et de la force musculaire, ainsi que la diminution de la salivation, limitent la consommation de certains aliments et, en particulier les plus difficiles à mastiquer tels que la viande. En conséquence, les personnes souffrant de mastication déficiente diminuent leur consommation de viande et se privent ainsi d'aliments riches en protéines, en fer et en vitamines. Sur le long terme, ce changement d'alimentation contraint entraine des carences qui aggravent l'état de santé de ces personnes déjà fragiles. Cet article pose les bases d'une nouvelle approche nutritionnelle pour les séniors afin de leur permettre un accès plus aisé aux produits carnés, sources de nutriments essentiels. Cet accès facilité passe par l'utilisation d'une nouvelle technologie, l'impression 3D alimentaire, pour la préparation de nouveaux aliments à base de viande, plus faciles à mastiquer et à déglutir. Mais, qui dit innovation, dit aussi néophobie. Aussi, l'étude des mécanismes de l'acceptabilité sociale est primordiale pour identifier les éventuels freins à la consommation d'aliments imprimés en 3D et ainsi, comprendre les besoins et attentes des futurs consommateurs.

L'impression 3D alimentaire, définition

L'impression 3D ne se cantonne plus désormais à l'industrie mécanique. Des domaines tels que la médecine ou la nutrition peuvent prétendre à des

innovations grâce à cette technologie de rupture. Diverses méthodes d'impression existent, comme le dépôt de cellules animales mais la technologie d'impression 3D alimentaire la plus utilisée est l'extrusion. Cette dernière peut paraitre simple à priori, car elle est composée d'un système de pression qui dépose des couches successives d'un matériau donné selon trois dimensions, les axes X, Y et Z. Mais, derrière cette apparente simplicité, se cache un grand nombre de méthodologies et une infinité de possibilités en termes de géométries à imprimer ou de fonctionnalités potentielles pour l'objet fabriqué. De ce fait, un grand nombre de phénomènes physiques (capacité plastifiante des matériaux, rétention en eau…), mécaniques (cisaillement, gonflement, rétractation…), chimiques (oxydations) et biologiques (interactions moléculaires) interviennent et influencent la fabrication et le devenir de l'aliment. L'analyse et la compréhension de ces mécanismes permettent d'une part, d'améliorer l'imprimabilité du matériau, qui est définie par Godoi et al. (2016) comme étant l'ensemble des propriétés permettant à celui-ci d'avoir une stabilité dimensionnelle suffisante pour supporter son propre poids et, d'autre part, d'apporter et/ou de conserver les fonctionnalités ou les propriétés des matériaux.
Lorsque l'on parle d'imprimer un aliment, la technologie d'extrusion est, à l'heure actuelle, la seule applicable à grande échelle et nécessite une préparation des ingrédients pour permettre leur extrusion au travers d'une buse. Les propriétés nutritionnelles des ingrédients choisis doivent être préservées, la sécurité sanitaire assurée et de nouvelles fonctionnalités peuvent être intégrées au futur aliment. Ainsi, ce procédé d'impression et son impact sur l'aliment doivent être étudiés. Pour ce faire, un certain nombre de moyens analytiques sont mis en œuvre : l'étude physico-chimique de la préparation à imprimer et de l'aliment imprimé (pH, température, teneur en eau…), l'étude rhéologique qui va permettre de caractériser et d'améliorer l'écoulement du produit pour le rendre imprimable en tenant compte des effets du procédé comme le taux de cisaillement subi par l'aliment lorsque ce dernier va sortir de la buse d'impression, ou bien encore une étude biochimique qui va permettre de comprendre les effets de l'impression 3D sur les molécules constituant l'aliment. Une fois l'aliment déposé selon la géométrie définie dans un fichier numérique, il reste à le rendre consommable, en ajoutant, par exemple, une étape de cuisson.
Les procédés utilisés pour fabriquer les aliments industriels, comme l'extrusion, ne sont pas visibles pour les consommateurs puisqu'effectués, en général, en usine. L'impression 3D alimentaire pourra être utilisée dans des conditions similaires : par exemple, au sein de cuisines collectives, mais également à domicile. Dans ce dernier cas, la phase d'extrusion sera visible et pourra potentiellement susciter des réactions et des questionnements légitimes de la part des consommateurs/utilisateurs. La façon dont cette technologie sera présentée/expliquée, va conditionner son acceptabilité sociale.

Accepter l'impression 3D alimentaire ? Par quels leviers ?

L'impression 3D alimentaire peut travailler à différentes échelles, depuis le niveau cellulaire jusqu'au niveau macroscopique. Au niveau cellulaire, une des voies d'application potentielle est la fabrication de tissu musculaire à partir de cellules souches. Il s'agit d'une application, pour l'heure à la marge, mais riche d'enseignements en termes d'acceptabilité. Dans leurs études, Carocho et al. (2015) et Siegrist et al. (2017) ont montré que, dans le cas de l'impression 3D de viande par dépôt de cellules sur un support, les consommateurs étaient à la recherche d'aliments les plus naturels possibles, et que la production traditionnelle de viande était mieux perçue que la " viande *in vitro* ", même si cette dernière devrait être plus respectueuse de l'environnement et du bien-être animal. Ces travaux soulignent également que les consommateurs/utilisateurs s'appuient sur des informations symboliques, mais à fort impact, pour évaluer un aliment (codes des additifs, technologie utilisée…).

Une enquête approfondie sur l'attitude des consommateurs à l'égard d'une nouvelle technologie telle que celle-ci et la diffusion d'informations simples et avisées seraient donc à même d'éclairer le consommateur/utilisateur de façon pertinente sur l'intérêt de ce nouveau procédé, c'est tout l'enjeu de notre collaboration avec l'unité TransitionS/IMREDD. Certains travaux ont déjà été menés et permettent de se rendre compte du travail à accomplir. En 2018, Brunner et al. ont questionné 2047 personnes sur leur ressenti concernant cette technologie en fonction du niveau d'information reçu. Ils ont constaté que les connaissances en matière d'impression 3D alimentaire étaient variables mais globalement faibles (2,33/6 sur l'échelle de Likert qui permet d'évaluer une attitude chez un individu). Néanmoins, ces auteurs ont pu tester l'effet positif sur les consommateurs d'ajouter des informations ciblées, comme le fait que la technologie pourrait les soutenir dans la préparation de repas sains et personnalisés, tout en y ajoutant une dimension ludique. Ces auteurs affirment avoir pu vaincre le phénomène de néophobie. Ceci confirme les travaux de Lupton (2017) qui affirme que, pour être accepté, une nouvelle technologie ou un nouvel aliment doit convaincre les consommateurs de son potentiel et de sa valeur, tout en les rassurant. Pour l'heure, de nombreuses études sur l'impression 3D d'aliments carnés, utilisent des additifs pour modifier leur texture et les rendre imprimables (Hamilton et al, 2015). L'utilisation d'additifs ajoute un frein supplémentaire à l'acceptabilité sociale du nouvel aliment où, à la néophobie, va s'ajouter le concept d'ultratransformation (ensemble de transformations physiques, chimiques ou biologiques obtenues par des procédés industriels). Evans et al. (2010) ont d'ailleurs mis en évidence que les consommateurs étaient aussi plus réticents aux modifications chimiques d'un aliment qu'aux modifications physiques. Or, pour l'instant, l'impression 3D alimentaire de produits carnés cumule ces deux types de transformation. Tout l'intérêt est donc de mener des recherches pour limiter au maximum l'ajout d'additifs de synthèse, tout en améliorant le procédé.

L'unité QuaPA a choisi de proscrire l'utilisation d'additifs de synthèse par différents moyens complémentaires. Tout d'abord, le procédé doit être optimisé et adapté à chaque matrice alimentaire. C'est l'objet de la première étude menée au sein de ce laboratoire pour concevoir une nouvelle imprimante 3D alimentaire (Portanguen et al., 2022) (Fig. 1 et 2). Le contrôle du débit d'extrusion, c'est-à-dire la quantité de matière délivrée par unité de temps, la température d'extrusion ainsi que la température du plateau d'impression (là où l'aliment est déposé) sont désormais maîtrisés. L'originalité de cette nouvelle imprimante réside en deux points essentiels : 1) l'adaptation, au niveau pilotage et électronique, d'un doseur de précision capable d'être programmé en fonction de la matrice alimentaire utilisée et, permettant un contrôle précis du dépôt, y compris lors des phases de rétractation de l'aliment, nécessaires lors des changements de direction déterminés par la géométrie de l'objet ; 2) le contrôle de la température du plateau d'impression. Alors que l'ensemble des imprimantes 3D travaille à chaud ou à température ambiante pour la phase de dépôt au niveau du plateau d'impression, le système développé ici permet de refroidir ce plateau. Ceci a pour conséquence de favoriser la gélification des matrices protéiques qui se produit à froid et de limiter l'ajout d'additifs de synthèse. Ceci pourrait contribuer à rassurer le futur consommateur. D'ailleurs, Lupton & Turner (2016) le confirment, en indiquant que le développement des technologies 3D en alimentaire ne se fera qu'à condition de conserver un côté " naturel " aux aliments. Cette vision permettrait aux consommateurs de préserver le côté affectif associé à la nourriture et de passer outre l'aspect transgressif de la technologie.

Outre le développement de l'imprimante, il faut aussi travailler sur la formulation de l'aliment et sur les propriétés intrinsèques des différents ingrédients. Plusieurs critères doivent alors être pris compte : leurs propriétés mécaniques (viscosité, comportement au cisaillement), leurs effets sur la texture de l'aliment et leurs propriétés nutritionnelles.

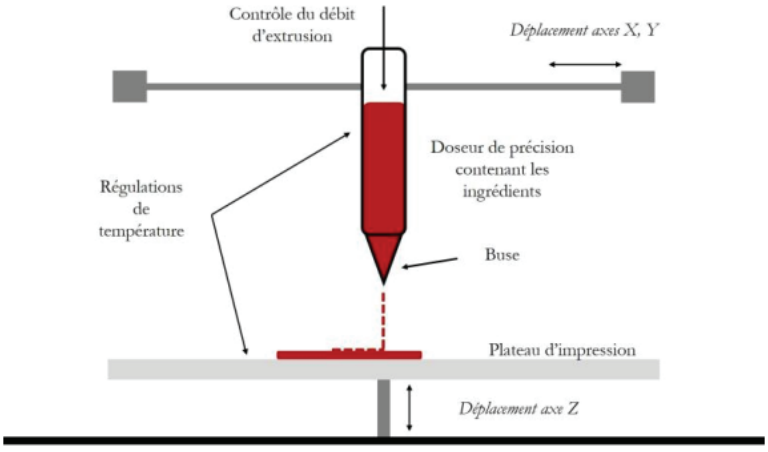


Figure 1 : Représentation schématique d'une imprimante 3D alimentaire.

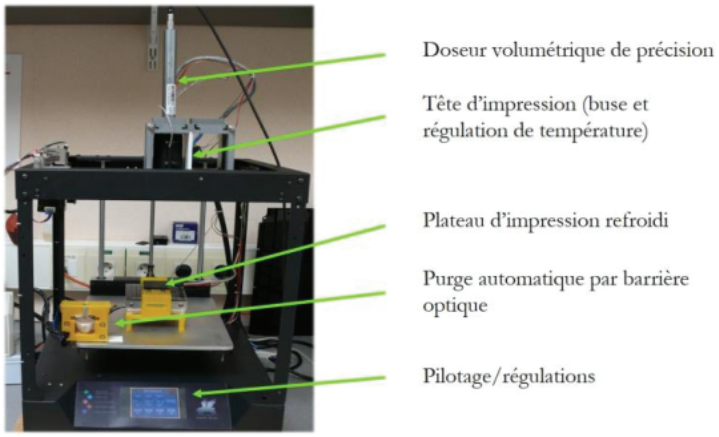


Figure 2 : Prototype d'imprimante 3D dédiée à la conception d'aliments fonctionnels carnés ou multi-sourcés.

Une des voies de texturation novatrice possible, actuellement étudiée dans notre unité, consiste à utiliser la réaction de glycation. Il s'agit d'une réaction biochimique naturelle, non enzymatique, et spontanée. Elle consiste à créer des liaisons covalentes intermoléculaires entre des protéines et des glucides. Cette réaction pose question du point de vue de l'acceptabilité sociale car, malgré son caractère naturel, elle peut être associée, dans l'imaginaire collectif, à une ultratransformation de l'aliment. Se pose alors un dilemme quant au rôle du scientifique : doit-il être totalement transparent et expliquer clairement comment est conçu l'aliment ou, doit-il se contenter de dire qu'un ingrédient connu, tel que du sucre, est ajouté ? Le niveau d'information est primordial et va probablement conditionner la réaction du consommateur. En effet, en fonction du niveau de connaissances scientifiques de celui-ci, le fait de lui parler de « molécules », de « liaisons covalentes » peut induire chez lui une crainte, potentiellement source de blocage.

L'étude de Lupton & Turner (2016) aborde également le débouché qui semble le plus important pour l'impression 3D alimentaire : la personnalisation, concept également mis en avant par Portanguen et al. (2019). En effet, si la perception des aliments fabriqués est orientée sur des aspects nutritionnels/santé, ou sur la lutte contre la malnutrition, alors la technologie pourrait devenir, pour le consommateur, un atout et non un frein à la consommation de produits imprimés. Les marchés de niches, la gestion des ressources naturelles, la sécurité alimentaire ou la créativité culinaire sont autant de facteurs qui permettront d'adopter ce type de procédé. L'impression 3D alimentaire pourrait, dans un avenir proche, avoir toute sa place en tant que nouveau procédé, et ne serait pas plus révolutionnaire, dans la conscience collective, que l'utilisation du four à micro-ondes à son époque. Même si, selon Brunner et al. (2018), le fait d'émettre des points de comparaison entre une nouvelle et une ancienne technologie ne

suffit pas à faire tomber les réticences concernant la nouvelle, une néophobie persistante, voire renforcée, peut être observée chez certaines personnes.
La génération " Z " (personnes nées à partir de 2000), rien qu'en France, représentera à l'horizon 2025-2030, 75% des actifs. Cette génération va bouleverser les habitudes alimentaires que nous connaissons actuellement par l'utilisation d'outils numériques, de plus en plus présents. La livraison à domicile à toute heure, l'influence des réseaux sociaux sur la façon de consommer, et le suivi de son alimentation par des applications dédiées font émerger de nouvelles façons de se nourrir, où l'impression 3D pourrait trouver sa place. D'ailleurs, selon plusieurs études, une personne sur deux dans la catégorie des 18-24 ans est prête à utiliser une imprimante 3D alimentaire à l'avenir (The NPD Groupe, 2017) ; Kantar TNS (2017). Selon The Nielsen Company (2015), quatre catégories de " Millennials " (personnes nées entre 1980 et 2000, appelées aussi génération " Y ") coexistent. En effet, des consommateurs soucieux de l'environnement et de l'impact environnemental des procédés liés à l'alimentation côtoient des personnes attirées par les nouvelles technologies, des personnes soucieuses de leur pouvoir d'achat, ou bien des personnes à la fois sensibles aux innovations, mais souhaitant conserver certaines valeurs traditionnelles. Ce sont toutes ces sensibilités que les chercheurs et ingénieurs doivent prendre en compte pour développer l'impression 3D alimentaire. Une autre catégorie de personnes, cette fois multigénérationnelle, influence, depuis quelques années, la façon de consommer, en particulier les produits carnés : ce sont les adeptes du flexitarisme, un mode de vie où la consommation de produits carnés est modérée, voire fortement réduite, mais encore présente dans l'alimentation. Alors que les végétariens représentent environ 1,7% de la population française et les végétaliens 0,5%, les flexitariens représentent 34% des foyers, avec 19% des flexitariens ayant moins de 35 ans (Kantar Worldpanel, 2016). Cette population, convaincue des problématiques écologiques actuelles, pourrait être sensible à des arguments relatifs à la valorisation de produits ou de coproduits de l'industrie de la viande, actuellement peu valorisés, tels que des morceaux riches en collagène et nécessitant des cuissons longues ou bien encore les abats. Ces coproduits, riches en nutriments essentiels peuvent être valorisés grâce à l'impression 3D. Les personnes sensibles à la préservation de l'environnement et à leur nutrition pourraient être également attentives à la limitation du gaspillage alimentaire que pourrait induire l'impression 3D.
La réaction du consommateur peut également être orientée par l'utilisation qu'il va faire de l'aliment. Lorsque nous parlons d'aliment fonctionnel, il est sous-entendu qu'une plus-value lui est apportée. C'est une des applications sur lesquelles nous travaillons également. La consommation d'aliments fonctionnels est actuellement très peu étudiée, quelques rares exemples ont montré qu'une population pouvait être, finalement, très réticente au fait de consommer un aliment aux vertus préventives contre les maladies cardiaques (Korsen-Bohr & O'Doherty Jensen, 2006). Dans cette étude, la place ambiguë de l'aliment, à la frontière de l'alimentation et de la médecine, était difficile à percevoir pour les patients. Néanmoins, il semble que les réserves soulevées par les

consommateurs-patients puissent être levées. C'est ce qu'affirme une étude récente (Conroy et al. 2021) qui a mis en évidence trois axes permettant de favoriser l'acceptabilité sociale des aliments fonctionnels : 1) la santé autogérée à l'aide de ces aliments, 2) l'établissement de la confiance par le partage des connaissances et de l'information, et 3) l'importance de l'heuristique des aliments fonctionnels afin qu'ils soient considérés comme un symbole culturel de la mise en œuvre de son propre bien-être. Même si la littérature scientifique liée à la conception d'aliments fonctionnels à tendance à s'enrichir, y compris pour les applications d'impression 3D, les études existantes sont rarement centrées sur les problématiques liées à l'acceptabilité sociale de ces nouveaux aliments. Dans les travaux de Kewuyemi et al. (2021), les aspects technologiques sont étudiés de façon approfondie ainsi que les aspects commerciaux. L'acceptabilité de l'aliment et le ressenti du consommateur ne sont abordés que de façon superficielle. Des auteurs comme Tkaczewska et al. (2021) ont réfléchi à la manière de concevoir un aliment fonctionnel à base de coproduits de l'industrie alimentaire. Selon eux, trois aspects sont à prendre en compte pour que l'aliment créé soit accepté par les consommateurs ciblés : 1) utiliser l'empathie du consommateur, ce qui implique essentiellement de connaître le consommateur/utilisateur en immergeant le concepteur dans la vie de celui-ci et en procédant à des tests précoces (visualisation des aliments) auprès du public visé ; 2) la visualisation et le prototypage rapide de l'aliment, qui consiste à créer des modèles et, si possible, les premières versions des prototypes pour un retour d'informations rapide sur les forces et faiblesses du produit ; 3) la collaboration entre acteurs de la formation auprès des consommateurs et de spécialisations différentes (exemple : sciences humaines et sociales et sciences du vivant).

En introduction de cet article, il a été mentionné que les pathologies bucco-dentaires liées à l'âge allaient fortement augmenter avec le vieillissement de la population. Parmi ces pathologies, les problèmes de mastication (pertes de dents, de force musculaire …) et les problèmes de déglutition (syndrome de dysphagie) induisent un changement de comportement dans la prise alimentaire ce qui modifie considérablement les apports nutritionnels. Ceci se traduit notamment par la baisse des apports en protéines qui contribue au phénomène de sarcopénie (fonte musculaire) qui touche 30 à 50% des personnes de plus de 80 ans dans le monde. Afin de permettre aux personnes souffrant de mastication déficiente de continuer à manger des produits carnés et de maintenir un apport en nutriments essentiels suffisant, la texture de l'aliment est primordiale et, l'impression 3D est un des moyens de la contrôler. Dans un grand nombre de cas, les problèmes de mastication et de déglutition sont liés à une xérostomie (sensation de bouche sèche) pouvant être associée ou non à une hyposialie (déficit de production de salive). Ces phénomènes compliquent la formation du bol alimentaire (masse compacte et homogène d'aliments ingérés, mastiqués et imprégnés de salive, et prête à être déglutie) et sa déglutition. En effet, la salive joue plusieurs rôles dans la formation du bol alimentaire mais aussi dans le maintien d'un bon état de la muqueuse buccale. Les personnes souffrant d'hyposialie présentent des irritations des muqueuses et ressentent des douleurs lors de la mastication et de

la déglutition de certains aliments, notamment la viande. Ainsi, elles évitent ces aliments. Le plaisir de manger disparaît progressivement lorsque des problèmes de mastication et de déglutition s'installent. Pour lutter contre les symptômes de la sensation de bouche sèche, il existe des substituts salivaires, le plus souvent sous forme de solutions à vaporiser dans la cavité buccale tout au long de la journée. D'après les études cliniques, ces substituts salivaires s'avèrent souvent inefficaces sur le long terme, et comme ils sont onéreux, les patients finissent par ne plus les utiliser (Piaton et al., 2021). D'autres substituts salivaires, extraits naturels de plantes ou de graines, ont été étudiés dans la littérature pour leurs effets sur le soulagement de la douleur chez les patients souffrant de xérostomie et ils s'avèrent au moins aussi efficaces, voire plus efficaces pour certains (Morales-Boso et al., 2017). Cependant, aucun substitut salivaire n'a été étudié dans le cadre de l'amélioration de la fonction masticatoire, mais uniquement dans le cadre de la diminution de douleur ou de la sensation de bouche sèche. Avec nos collègues chercheurs et dentistes du Centre de Recherche en Odontologie Clinique (INRAE/Université Clermont-Auvergne), nous caractérisons les propriétés physiques et rhéologiques de différents substituts salivaires, du commerce et à base d'extraits naturels. Les substituts salivaires du commerce sont très différents en termes de composition. Ils peuvent être à base huileuse ou aqueuse et contiennent souvent des arômes, des ions, et parfois des protéines. Ils sont généralement très fluides car leur composition est proche de l'eau ou d'huiles végétales. Un exemple de potentiel substitut salivaire naturel est le mucilage. Celui-ci est un gel extrait de graines mucilagineuses, telles que les graines de lin et est plus visqueux que les substituts salivaires du commerce (étude actuellement en cours au sein de l'unité QuaPA) (Fig. 3). L'extraction du mucilage est très simple et peu onéreuse puisqu'il suffit de laisser les graines tremper dans de l'eau froide ou de les faire bouillir. Cependant, la consistance du mucilage pourrait poser des problèmes d'acceptabilité car elle peut évoquer la consistance du mucus ou de la salive.

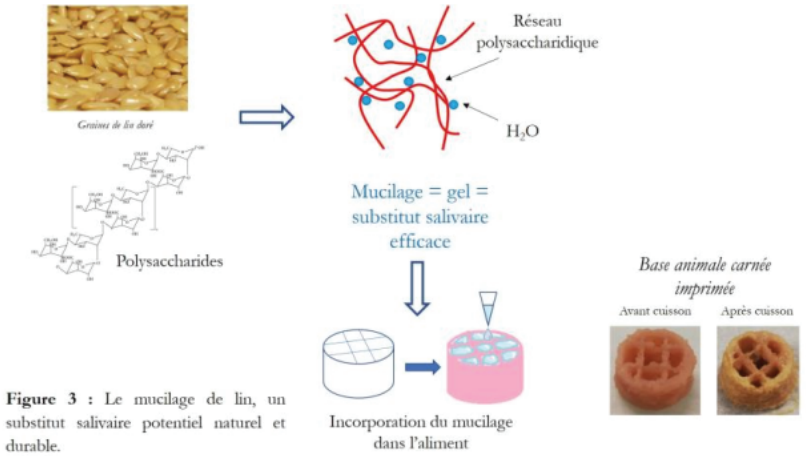


Figure 3 : Le mucilage de lin, un substitut salivaire potentiel naturel et durable.

Toutefois, l'unité QuaPA d'INRAE travaille sur une approche originale qui consiste à intégrer le mucilage directement dans un aliment, de préférence riche en protéines, via l'impression 3D. Une nouvelle fonctionnalité serait alors apportée, avec un effet sur la santé orale. Les avantages de l'incorporation de mucilage dans un aliment en utilisant l'impression 3D seraient : 1) améliorer la mastication de manière efficace, par le contrôle de la libération de quantités de mucilage adéquates dans la cavité orale, et 2) masquer la consistance de ce potentiel substitut salivaire dans l'aliment. Les analyses en laboratoire ne remplaceront jamais un test sur un panel de consommateurs. Il convient alors de discriminer les aspects techniques des aspects hédoniques : quelle sera la sensation en bouche ? Sera-t-elle agréable ou suscitera-t-elle un phénomène de rejet ? Encore une fois, les informations transmises aux consommateurs seront primordiales et c'est là que le scientifique, spécialiste en sciences du vivant atteint ses limites et où le rôle du sociologue est essentiel. En effet, dans la plupart des études, les scientifiques n'incluent pas le rôle de la technologie dans le processus de décision, et circonscrivent les critères d'acceptabilité aux seuls aspects organoleptiques (goût, couleur). Une démarche de science participative apparaît comme un élément indispensable pour finaliser la conception d'un nouvel aliment. Cette approche a déjà débuté : la présentation de l'impression 3D alimentaire a eu lieu auprès d'un panel de personnes de plus de 55 ans lors de semaine nationale de la nutrition en novembre 2022 à Chamalières (63) (les résultats sont en cours d'analyse en partenariat avec l'unité TransitionS) et, une autre session est prévue, dans un cadre associatif en avril 2023. De plus, l'unité QuaPA a eu l'opportunité de présenter ces travaux lors du Salon International de l'Agriculture 2023 où 99% des réactions des visiteurs étaient positives. Pour les autres personnes, des explications ciblées ont pu contribuer à lever certaines réticences.

Conclusion

La mise au point d'un nouvel aliment via une technologie émergente, telle que l'impression 3D alimentaire, requiert différentes étapes de développement, au niveau technologique, nutritionnel, mais également au niveau de l'acceptabilité sociale du nouvel aliment et de la technologie mise en œuvre. Ceci nécessite une approche pluridisciplinaire ainsi qu'une collaboration entre des équipes de recherche issues de deux mondes différents : les sciences humaines et sociales et les sciences du vivant. Ainsi, la collaboration pérenne entre les unités QuaPA et TransitionS/IMREDD, désormais formalisée par le projet SAMASTIC (Coupler sciences des aliments, mastication et sciences et technologies de l'information et de la communication pour concevoir des aliments fonctionnels imprimés en 3D socialement acceptables et destinés à des populations présentant des déficiences masticatoires). Action Nouvelle Soutenue par le département INRAE/Transform), représente une évolution positive dans la façon de mener ce type de recherche. Les aliments

conçus et la technologie d'impression 3D utilisée sont destinés à améliorer le quotidien et l'état de santé général de personnes fragiles. Compte-tenu de leurs difficultés, de leurs pathologies, la prise en compte de leurs besoins et envies est primordiale, d'une part pour guider les chercheurs dans leurs travaux, mais surtout pour que ces personnes soient impliquées dans une démarche de science participative, avant tout destinée à les aider.

Bibliographie

Brunner, T. A., Delley, M., & Denkel, C., 2018. « Consumers' attitudes and change of attitude toward 3D-printed food ». *Food Quality and Preference, 68*, 389-396.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R., 2015. « Natural food additives: Quo vadis? ». *Trends in Food Science & Technology, 45*, 284-295.

Conroy, D. M., Gan, C., Errmann, A., & Young, J., 2021. « Fortifying wellbeing: How Chinese consumers and doctors navigate the role of functional foods ». *Appetite, 164*, 105296. https://doi:10.1016/j.appet.2021.105296

Evans, G., de Challemaison, B., & Cox, D. N., 2010. « Consumers' ratings of the natural and unnatural qualities of foods ». *Appetite, 54*, 557-563.

Godoi, F., Prakash, S., & Bhandari, B., 2016. « 3D printing technologies applied for food design: Status and prospects ». *Journal of Food Engineering, 179*, 44-54.

Hamilton, C. A., Alici, G., & in het Panhuis, M., 2018. « 3D printing Vegemite and Marmite: Redefining "breadboards". *Journal of Food Engineering, 220*, 83-88.

KANTAR TNS. FoodTech: « les Millenials révolutionnent l'alimentation ». www.mbanmci.com. https://mbamci.com/foodtech-millenials-et-alimentation/, 2017.

KANTAR WORLDPANEL « A la découverte des flexitariens : Qui sont ces foyers qui souhaitent réduire leur consommation de protéines animales ? » Newsletter n°48. https://www.kantarworldpanel.com/fr/A-la-une/Newsletter-48, 2016.

Kewuyemi, Y. O., Kesa, H., & Adebo, O. A., 2021. « Trends in functional food development with three-dimensional 3D food printing technology: prospects for value-added traditionally processed food products ». *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-38.

Korzen-Bohr, S., & O'Doherty Jensen, K., 2006. « Heart disease among post-menopausal women: acceptability of functional foods as a preventive measure ». *Appetite, 46*2, 152-163. https://doi:10.1016/j.appet.2005.11.003

Lupton, D., & Turner, B., 2016. « 'Both Fascinating and Disturbing': Consumer Responses to 3D Food Printing and Implications for Food Activism ». In K. E. Tanja Schneider, Catherine Dolan and Stanley Ulijaszek Ed., *Digital Food Activism* pp. 17. London: Routledge.

Lupton, D., 2017. « 'Download to delicious': Promissory themes and sociotechnical imaginaries in coverage of 3D printed food in online news sources ». *Futures, 93*, 44-53.

Morales-Bozo, I., Ortega-Pinto, A., Rojas Alcayaga, G., Aitken Saavedra, J. P., Salinas Flores, O., Lefimil Puente, C., Lozano Moraga, C., Manriquez Urbina, J. M., & Urzua Orellana, B., 2017. « Evaluation of the effectiveness of a chamomile Matricaria chamomilla and linseed Linum usitatissimum saliva substitute in the relief of xerostomia in elders ». *Gerodontology, 34*, 42-48.

Piaton, S., Duconseille, A., Roger-Leroi, V., & Hennequin, M., 2021. « Could the use of saliva substitutes improve food oral processing in individuals with xerostomia? A systematic review ». *J Texture Stud, 52*, 278-293.

Portanguen, S., Tournayre, P., Sicard, J., Astruc, T., & Mirade, P.-S., 2019. « Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review ». *Trends in Food Science & Technology, 86*, 188-198.

Portanguen, S., Tournayre, P., Gibert, P., Leonardi, S., Astruc, T., & Mirade, P. S., 2022. « Development of a 3D printer for the manufacture of functional food protein gels ». *Foods*, 458.

Siegrist, M., & Sutterlin, B., 2017. « Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat ». *Appetite, 113*, 320-326.

THE NIELSEN COMPANY « Zoom sur les Millenials ». www.nielsen.com, 2015.

THE NPD GROUP « Millenials : les 18-34 ans redessinent la restauration de demain ». www.npdgroup.fr, 2017.

Tkaczewska, J., Kulawik, P., Morawska-Tota, M., Zajac, M., Guzik, P., Tota, L., Pajak, P., Dulinski, R., Florkiewicz, A., & Migdal, W., 2021. « Protocol for Designing New Functional Food with the Addition of Food Industry By-Products, Using Design Thinking Techniques-A Case Study of a Snack with Antioxidant Properties for Physically Active People ». *Foods, 10*.

WHO, Beard, J., Officer, A., Cassels, A., Bustreo, F., Worning, A. M., & Asamoa-Baah, A., 2016. « Rapport mondial sur le vieillissement et la santé ». In pp. 296: OMS.