



**UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
&
AgroSupDijon (UMR PAM)**

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences des aliments

**Etude des interactions dans la formation d'agrégats thermiques
mixtes entre globulines de pois et β -lactoglobuline : application à
l'élaboration de gels acides**

Par

Mohamed Lazhar CHIHI

Soutenue publiquement le 12 juillet 2016

Jury :

Pr. MARCHESSEAU, Sylvie	(Univ. Montpellier)	Rapporteur
Pr. DEGRAEVE, Pascal	(Univ. Lyon 1)	Rapporteur
Pr. CROGUENNEC, Thomas	(Univ. Rennes)	Examineur
Pr. SAUREL, Rémi	(AgroSup Dijon)	Directeur de thèse
Dr. SOk, Nicolas	(AgroSup Dijon)	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein de l'équipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) d'AgroSup Dijon dans le cadre d'une bourse du gouvernement Algérien.

Tout d'abord je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant pour le courage qu'il m'a accordé pour réaliser ce travail de thèse.

J'exprime ma gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur Rémi SAUREL, pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail, ses nombreux conseils scientifiques et ses encouragements qui m'ont permis d'avancer au mieux dans ce travail, son soutien et ses qualités humaines. Merci beaucoup.

Je tiens à remercier mon co-directeur de thèse, le Docteur Nicolas SOK, pour son encadrement et sa contribution à mon travail quotidien, ainsi que pour ses conseils précieux et son aide durant ce projet de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à mon jury, à Madame Sylvie MARCHESSEAU, Monsieur Thomas CROGUENNEC, Monsieur Pascal DEGRAEVE qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur Hadji ZARHOUNI, Directeur Central de l'Intendance, de m'avoir accordé une bourse afin de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier profondément tout l'encadrement de l'équipe PAPC (tous trop nombreux pour être cités ici) et en particulier à Bernadette, et je salue à cette occasion leur sympathie et leur participation active dans cette thèse. Ce remerciement serait incomplet, si je n'adressais pas ma gratitude à Alexandra pour sa bonne humeur au quotidien.

Je tiens à remercier mes collègues (stagiaires, doctorants et post-doctorants passés ou présents) : à Leila, Jean Luc, Attaf, Soufyane, Antonio, François, Anne, Nassredine et en particulier à Koi et Yanis, pour leur implication de près ou de loin dans ce travail.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : mes parents, mes frères, mes sœurs, mes enfants, tous mes proches en particulier à Ibtihaïl, Mourad, Ismahane et Fayçal. Un grand merci qui ne suffit pas pour exprimer ma reconnaissance à ma femme qui m'a accompagné, encouragé, et supporté tout au long de ce projet.

Résumé

Dans un contexte de diversification des sources protéiques alimentaires, les protéines de pois représentent un ingrédient de choix et pourraient être associées à des protéines laitières comme celles du lactosérum dans la fabrication de nouveaux aliments. Dans ce travail, le comportement d'agrégation thermique (1h à 85°C), préalable à une gélification acide, des globulines de pois (Glob) seules et en mélange avec la β -lactoglobuline (β lg), a été étudié en fonction de la concentration totale en protéine, du ratio massique β lg/Glob et de la force ionique. La caractérisation des agrégats solubles a été réalisée par une combinaison de techniques analytiques telles que la détermination de l'hydrophobicité de surface, la quantification des ponts disulfures, la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC) et l'électrophorèse SDS-PAGE. La formation d'agrégats mixtes semble être gouvernée par des interactions intermoléculaires non covalentes, mais aussi des liaisons covalentes entre la β lg et les sous-unités de légumine notamment à faible force ionique (5 mM NaCl). Ces dernières semblent contrôler les caractéristiques méso-structurales des agrégats mixtes formés (haut poids moléculaire et diamètre réduit < 110 nm) comparativement aux agrégats formés de globulines seules (diamètre > 150 nm). Le deuxième volet de l'étude concernait la formation de gels acides obtenus par acidification au glucono- δ -lactone, soit à partir des agrégats mixtes solubles caractérisés précédemment, soit à partir de mélanges d'agrégats thermiques de chaque protéine obtenus séparément. Les différents paramètres liés à la cinétique d'acidification et à la gélification (temps et pH de transition sol/gel, propriétés mécaniques par rhéologie dynamique et analyse de la microstructure par Microscopie Confocale à Balayage Laser, capacité de rétention d'eau) ont été évalués. Les résultats démontrent que les agrégats mixtes issus des mélanges thermisés des deux protéines permettent d'obtenir des gels plus élastiques avec une structure fibrillaire plus ordonnée et moins poreuse, avec des caractéristiques proches de celles des gels formés d'agrégats purs de Blg.

Abstract

In the context of protein source diversification, pea protein is a promising ingredient and may be associated with milk proteins such as whey proteins in the production of new food products. In the present work, the thermal aggregation (85°C - 1 h) of pea globulins (Glob) alone and in admixture with β -lactoglobulin (β lg), prior to acid gelation, was studied as a function of total protein concentration, β lg/Glob weight ratio and ionic strength. The characterization of soluble aggregates was carried out by combining different analytical methods such as surface hydrophobicity determination, disulfide bridge quantification, dynamic light scattering (DLS), size exclusion chromatography (SEC-HPLC) and SDS-PAGE electrophoresis. The formation of mixed aggregates seems to be governed by non-covalent intermolecular interactions, but also by covalent bonds between β lg and legumin subunits at low ionic strength (5 mM NaCl). The latter seem to control the structural features of mixed aggregates (high molecular weight and reduced diameter <100 nm) compared to pure globulin aggregates (diameter > 150 nm). The second part of this work investigated the formation of acid gels by glucono- δ -lactone, obtained either from soluble mixed aggregates such as characterized previously, either from mixtures of thermal aggregates of the two proteins prepared separately. The parameters associated to acidification kinetics and gelation (time and pH at sol/gel transition, mechanical properties by dynamic rheology and microstructure analysis by Confocal Scanning Laser Microscopy, water holding capacity) were evaluated. The results showed that mixed aggregates from heat-treated initial mixtures of the two proteins provides more elastic acid gels with a more regular and less porous fibrillar structure having close characteristics to those of pure β lg gels.

Liste des Abréviations

ANS: anilinonaphtalène-8-sulfonate

α -la: alpha-lactalbumine

β lg: beta-lactoglobuline

BSA: Sérum bovine albumine

Cas: caséine

C_{g_a} : concentration minimale de gélification acide

$C_{g_{th}}$: concentration minimale de gélification thermique

CN: conditions native

CNR: conditions non-réductrices

CR: conditions réductrices

Cre : capacité de rétention de l'eau

CV: convicilin 7S

Dh : diamètre hydrodynamique

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DTNB:acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque

DTT: dithiothreitol

DSC (=AED): Analyse enthalpique différentielles (Differential Scanning Calorimetry)

G' : module de l'élasticité (ou de stockage) mesuré par rhéologie à faible déformation

G'' : module de viscosité(ou de perte) mesuré par rhéologie à faible déformation

GDL : glucono- δ -lactone

Glob: globuline de pois 11S

Gp : point gel

H_0 : hydrophobicité de surface

$L\alpha\beta$: sous-unités de légumine acide et basique

$L\alpha$: sous-unité acide de légumine

$L\beta 1-2$: sous-unité basique de légumine

Leg: legumin de pois 11S

Lox: lipoxygénase

M_w : poids moléculaire

NEM : N-ethylmaleimide

pI : point isoélectrique

S-/SS: réactions d'échanges sulfhydryls/ponts disulfures

SDS-PAGE: électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide

SEC-HPLC: chromatographie d'exclusion stérique de haute performance

$\tan \delta$: rapport G''/G'

Td : température de dénaturation

Tonset : température de début de dénaturation

V: vicilin de pois 7S

WPI: protéines de lactosérum

ΔH_d : enthalpie de dénaturation

(ζ) : potentiel Zeta

Liste des tableaux

Chapitre I : Etude bibliographique.

Tableau.I.1. Composition moyenne en acides aminés des fractions protéiques du pois et du soja.12

Tableau.I.2. Composition moyenne en acides aminés de la β -lactoglobuline (Gordon, et al. 1961; Stein & Moore 1949).....16

Chapitre III : Préparation et caractérisation des matières premières.

Tableau.III.1. Composition de la farine de pois en fractions azotées.....76

Tableau.III.2. Composition physicochimique de la farine et la fraction globuline76

Tableau.III.3. Rendement d'extraction de fractions de globulines.....77

Tableau.III.4. Teneurs en groupements (S^-) et en ponts disulfures (SS) dans les fractions purifiées de globulines sous différentes conditions.....82

Tableau.III.5. Hydrophobicité de surface(H_0) et la charge de surface (Potentiel Zeta (ζ)) des fractions de globuline natives à 2% (m/m)83

Tableau.III.6. Propriétés thermiques des fractions de Glob préparées sous différentes conditions ...85

Tableau.III.7. Composition de l'isolat de lactosérum en fractions azotées87

Tableau.III.8. Composition en fractions azotées de la β lg88

Tableau.III.9. Rendement d'extraction de β lg à partir de l'isolat de lactosérum.88

Tableau.III.10. Teneurs en groupements (S^-) et en ponts disulfures (SS) dans les fractions purifiées de β lg sous, préparées sous différentes conditions91

Tableau.III.11. Hydrophobicité de surface et Potentiel Zeta (ζ) des fractions natives de β lg à 2% (m/m) à 5 et 100 mM NaCl à pH 7,2.....92

Tableau.III.12. Températures et énergie de dénaturation des fractions de β lg préparées à pH 7,2 et à différentes forces ioniques.....93

Tableau.III.13. Données de gélification de Glob et β lg, en fonction de la concentration protéique, traités sous différentes conditions96

Chapitre IV : Formation et caractérisation des agrégats solubles.

Tableau.IV.1. Quantification des groupes sulfhydriles (S^-) et des ponts disulfures (SS) dans les échantillons de β lg et Glob natifs, et les agrégats solubles des mélanges β lg/Glob.....105

Tableau.IV.2. Données d'analyse thermique de β lg, de Glob et des mélanges de protéines à différents ratios massique β lg/Glob préparées sous différentes conditions125

Tableau.IV.3. Distribution de taille et diamètre hydrodynamique Dh pour (a) : échantillons non chauffés et (b) : agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg / Glob).	128
--	-----

Tableau.IV.4. Distribution de taille et diamètre hydrodynamique Dh des agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg / Glob).....	132
--	-----

Tableau.IV.5. Pourcentage relatif des aires des pics SEC-HPLC calculé par intégration correspondant aux fractions de protéiques obtenues dans les Figures .IV.16. et IV.17.	136
---	-----

Chapitre V : Gélification à froid des agrégats solubles.

Tableau.V.1. Propriétés de gélification acides des agrégats de β lg, Glob préparées à différentes concentrations protéiques, en présence de GDL à 25 °C	159
--	-----

Tableau.V.2. Propriétés de gélification des gels préparés à partir des agrégats mixtes à différents ratios massiques β lg/Glob (voie 1) en présence de GDL (0,68% m/m) à 25 °C.	164
---	-----

Tableau.V.3. Propriétés de gélification des gels acides préparés à partir de mélanges d'agrégats (voie 2) à différents ratios en présence de GDL à 25 °C.....	168
--	-----

Liste des figures

Chapitre I : Etude bibliographique.

Figure.I.1. Modèle de la structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère représente un polypeptide acide α ou basique β , constitutifs des sous-unités des légumine (Marcone, et al. 1998a).....	8
Figure.I.2. Composition et structure des principales fractions de protéines de pois, et assemblage des sous-unités constitutives des globulines de pois 7S et 11S, et potentiels sites de clivage (d'après Croy et al., 1980 ; Gatehouse et al., 1979, 1981 ; Tzitzikas et al., 2006).	11
Figure.I.3. Modèle de structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline en solution aqueuse selon (Brownlow, et al. 1997).....	14
Figure.I.4. Etats polymériques de la β lg en solution aqueuse en fonction du pH selon (Hambling, et al. 1992)	15
Figure.I.5. Liaisons susceptibles de se former entre les acides aminés des chaines de protéines.	18
Figure.I.6. Modèle d'agrégation thermique en 3 étapes de la β -lactoglobuline (Aymard, et al. 1996; Le Bon, et al. 1999)	24
Figure.I.7. Proposition de mécanisme pour la formation d'agrégats de β -lactoglobuline et type de liaisons en fonction du pH (Zúñiga, et al. 2010).	25
Figure.I.8. Formation de gels filamenteux et de gels particuliers d'après (Bryant & McClements 1998; Nicolai & Durand 2013).....	32
Figure.I.9. Représentation schématique de la stabilisation de la structure de gels acides de lactosérum par la formation de ponts disulfures (Alting, et al. 2003).	33
Figure.I.10. Variation (a) du module de conservation (G') et (b) tang δ à 20 °C en fonction de la diminution de pH en présence de GDL, pour les agrégats de (PP), fractions Vic et Leg préparés à une concentration de 4, 4, 3,5% respectivement.	36
Figure.I.11. Thermogrammes de DSC pour (a) la protéine de soja (PS), (b) le mélange MCN/PS à une concentration de 12,5% (m/m) (Beliciu & Moraru 2011)	38
Figure.I.12. Evolution des modules d'élasticité (G') en fonction du temps pendant le chauffage (90 °C/60min) de mélanges protéines de soja / WPI (à 6% de protéines totales) à pH 7 et 0,1M NaCl.	40
Figure.I.13. Effet de l'incorporation de protéines de soja et de caséinate de sodium à quantité équivalente (ratio de 50/50, soja/lait écrémé et caséinate de sodium/lait écrémé) sur les propriétés texturales du yaourt (Kolar, et al. 1979).	42

Figure.I.14. Evolution du module d'élasticité (G') en fonction du temps pour les gels acides mixtes à base de lait écrémé et de concentré de protéines de soja à différents ratios massiques (**lait/soja**)43

Figure I.15. Représentation schématisée de la démarche scientifique47

Chapitre II : Matériels et Méthodes.

Figure.II.1. Schéma d'extraction de la fraction de globulines de pois, selon le protocole de **Créveieu et al (1996)**.51

Figure.II.2. Schéma d'extraction des fractions β lg selon le protocole de **Konrad,et al. (2000)**.....53

Chapitre III : Préparation et caractérisation des matières premières.

Figure.III.1. Profil SDS-PAGE des fractions globulines en conditions non dénaturantes et en conditions dénaturantes78

Figure.III.2. Solubilité des globulines en fonction du pH et de la force ionique préparées à différents force ionique.....80

Figure.III.3. Thermogrammes de fractions Globulines 10% (m/m) chauffée à 1 °C/min, à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl, à pH 786

Figure.III.4. Profil SDS-PAGE des fractions protéiques de la poudre d'isolat de lactosérum et l'extrait purifié de β lg en conditions non dénaturantes et dénaturantes réductrices (SDS+DTT).....89

Figure.III.5. Solubilité de β lg en fonction du pH et de la force ionique pour des suspensions à 1% (m/m) d'isolats purifiés de β lg90

Figure.III.6a. Thermogrammes de la fraction de β lg à 10% (m/m) et force ionique de 5mM NaCl chauffé à 1 °C/min.....94

Figure.III.6b. Thermogrammes de la fraction de β lg à 10% (m/m) à 100 mM NaCl, à pH 7,2 chauffé à 1 °C/min.....94

Chapitre IV : Formation et caractérisation des agrégats solubles.

Figure.IV.1. Taux d'agrégats solubles dans les mélanges de β lg/Glob à différents ratios massiques et des concentrations 1 et 2% (m/m), à force ionique de 5 et 100 mM NaCl et à pH 7,2.100

Figure.IV.2. Hydrophobicité de surface (H_0) des protéines natives et des agrégats solubles de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob préparés à concentration de 1 et 2% et une force ionique de 5mM NaCl à pH 7,2.....102

Figure.IV.3. Hydrophobicité de surface (H_0) des protéines natives et des agrégats solubles de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob préparés à une concentration de 1 et 2% et une force ionique de 100 mM NaCl à pH 7,2.104

La **Figure.IV.4.** Potentiel Zeta (ζ) des agrégats de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/ Glob, formés à 5 et 100 mM NaCl et à une concentration 2% (m/m) et à pH 7,2...108

Figure.IV.5. Potentiel Zeta (ζ) des agrégats de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/ Glob, formés à 5 et 100 mM NaCl et à une concentration protéique 1% (m/m) et à pH 7,2.110

Figure.IV.6. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Natives, Condition Non Réductrices, et Conditions Réductrices des agrégats solubles (2%) de β lg, (2%) de Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob à une force ionique de 5 mM NaCl.....111

Figure.IV.7. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Natives, Non Réductrices, et Conditions Réductrices des agrégats solubles de β lg, Glob et le mélange de différents ratios massiques β lg/Glob à une concentration de 2% et une force ionique de 100mM NaCl.....116

Figure.IV.8. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Native, Condition non Réductrices et Condition Réductrices des agrégats solubles de mélange β lg/ Glob avec un ratio massique 50/50 en présence ou non de NEM à une force ionique de 5 mM NaCl118

Figure.IV.9. Profil d'élution des fractions de viciline et légumine par une colonne d'affinité (DEAE sepharose) sous gradient linéaire de sel (NaCl) de 0-250 mM NaCl120

Figure.IV.10. Profil SDS-PAGE (15%) en Conditions Natives, Conditions non Réductrices et Réductrices (SDS+DTT) des différentes fractions après purification et concentration120

Figure.IV.11. Profil SDS-PAGE 10%, en Conditions Native, Non Réductrices et Réductrices des agrégats de Leg et β lg, et leur rapport massique de mélanges β lg/Leg à différents ratios, à une force ionique de 5 mM et une concentration massique de 2%122

Figure.IV.12. Thermogrammes de mélanges β lg/ Glob à 2% (m/m) chauffée à 1 °C/min, à une force ionique de 5 et 100mM NaCl, à pH 7.2126

Figure.IV.13. Distribution de taille des protéines natives de β lg et de Glob à une concentration de 2%, à 5 mM NaCl et pH=7,2, à une dilution de 0.1%.127

Figure.IV.14. Distribution de taille des agrégats protéiques de β lg, Glob et des agrégats issus de mélanges (β lg/Glob) à différents ratios 30/70, 50 /50, 70 /30, préparés à une concentration de 2%, 5 mM NaCl, pH 7,2 et à une dilution de 0,1%.129

Figure.IV.15. Distribution de taille des agrégats protéiques de β lg, Glob et des agrégats issus de mélanges (β lg/Glob) à différents ratios 30/70 ; 50 /50 ; 70 /30 préparés à une concentration de 2%, 100 mM en NaCl, pH 7,2 et à une dilution de 0,1%.131

Figure.IV.16. Profils SEC-HPLC des Glob et β lg étudiés. **(a):** courbe d'étalonnage de la colonne TSK G 6000 PW_{xl}, **(b):** protéine native (β lg, Glob) à une concentration initiale de 2%.134

Figure.IV.17. Profils SEC-HPLC des agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg/Glob) à différents ratios, préparés à 85 °C pendant 60 min, et à une concentration initiale de 2%, à une force ionique 5 mM NaCl et à pH 7,2.	135
Figure.IV.18. Profils SEC-HPLC des agrégats de β lg, Glob et les mélanges (β lg/Glob) à différents ratios préparés à (85 °C pendant 60 min) et une concentration initiale de 2%, à une force ionique 100 mM NaCl et pH 7,2.	140
Figure.IV.19. Profil SDS-PAGE en conditions non réductrices (CNR), conditions réductrices (CR) des fractions β G' ₁ , β G' ₂ , β G' ₃ des différents ratios β lg/Glob respectivement 50/50 (a), 70/30 (b) collecté par fractionnement SEC-HPLC à une force ionique de 5 mM en NaCl et pH 7,2. (a): ratio 50/50.....	141
Figure.IV.20. Schéma du mécanisme d'agrégation des agrégats solubles mixtes à 5 et 100 mM NaCl	145

Chapitre V : Gélification à froid des agrégats solubles.

Figure.V.1. Diagramme d'état sol/gel thermique des solutions protéiques β lg/Glob dénaturées à 85 °C pendant 60 min en mélanges à pH 7,2, et à 5 mM NaCl.	149
Figure.V.2. Concentration minimale de gélification C_{ga} à froid des agrégats de (a) :100% β lg; (b) :100% Glob après 24H d'incubation à 25 °C.	150
Figure V.3. Diagramme d'état sol/gel-acide après l'ajout de GDL dans les agrégats solubles de β lg/Glob dénaturés en mélange à une température de 25 °C.....	151
Figure.V.4. Cinétique d'acidification des agrégats solubles à différentes concentrations protéiques par ajout de GDL (0,4%-0,97%) en fonction du temps d'incubation (24 heures) à une température de 25 °C. (a): Glob ;(b) : β lg.	154
Figure.V.5. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob à 4% (m/m) et de mélanges chauffés simultanément à différents ratios β lg/Glob. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0,68%) et suivie en fonction du temps d'incubation (24 heures) à une température de 25 °C	155
Figure.V.6. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob 4% (m/m) et les mélanges mixtes chauffés séparément à différent ratios β lg/Glob. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0,68%) et suivie en fonction du temps d'incubation (24 heures) à 25 °C.....	156
Figure.V.7. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH des agrégats de β lg à différentes concentrations protéiques respectivement de 3%, 4%, 4,5% incubés en présence de GDL, à 25 °C pendant 10 heures.....	157
Figure.V.8. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH des agrégats de Glob à différentes concentrations protéiques respectivement de 4%, 5%, 6% ; incubés en présence de GDL, à 25 °C pendant 10 heures.....	158

Figure.V.9. Spectres mécaniques des gels acides de β lg à différentes concentrations à 25 °C ; **(a)** G' et G'' en fonction de la fréquence; **(b)** $\tan \delta$ en fonction de fréquence en fin de gélification après 10 heures à 25 °C160

Figure.V.10. Spectres mécaniques des gels acides de Glob à différentes concentrations à 25 °C ; **(a)** G' et G'' en fonction de la fréquence; **(b)** $\tan \delta$ en fonction de fréquence en fin de gélification.....161

Figure.V.11. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH, pour des agrégats de β lg, de Glob et des mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob à une concentration protéique de 4% incubés en présence de GDL (0,68% m/m) pendant 10 heures à 25 °C.....163

Figure V.12. Spectres mécaniques (G' , G'' en fonction de la fréquence) en fin de gélification (après 10 heures) à 25 °C des gels mixtes (voie 1) préparés à différents ratios massiques β lg/Glob et à une concentration protéique de 4%.....165

Figure.V.13. Spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) des gels mixtes acides de β lg/Glob à une concentration de 4% en fin de gélification (après 10 heures) à 25 °C.....166

Figure.V.14. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH pour des mélanges d'agrégats à différents ratios β lg/Glob obtenus par la voie 2 à une concentration protéique de 4%, incubés en présence de GDL pendant 10 heures à 25 °C168

Figure.V.15. Spectres mécaniques (G' , G'' en fonction de la fréquence) en fin de gélification (après 10 h) à 25°C pour des gels mixtes préparés à partir des mélanges d'agrégats (voie 2) à une concentration protéique de 4%169

Figure.V.16. Spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) en fin de cinétique de gélification, pour des gels mixtes de β lg/Glob préparés selon la voie 2, à une concentration protéique de 4 % et à 25 °C170

Figure.V.17. Capacité de rétention d'eau des gels de β lg, Glob et de mélanges d'agrégats à différents ratios β lg/Glob respectivement de 15/85 ; 30/70 ; 50/50 ; 70/30 ; 85/15 obtenus par gélification acide selon la voie 1 et la voie 2 à une concentration protéique de 4%172

Figure.V.18. Images microscopiques par MCBL (Barre d'échelle = 100 μ m) des gels acides de β lg et Glob ainsi que des différents gels acides mixtes, obtenus à partir des agrégats de β lg / Glob et préparés selon la voie 1 et la voie 2 après 24h d'incubation à 25 °C. La concentration protéique est de 4% (m/m) pour l'ensemble des échantillons175

Annexe

Figure.1. Concentration minimale de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) (a) β -lactoglobuline, (b) Globuline de pois ; chauffage à 85°C pendant 60 mn à 5 mM NaCl, pH 7,2).207

Figure.2. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob 4,5% (m/m) et les mélanges mixtes chauffé simultanément à différents ratios β lg/Glob respectivement de 30/70 ; 50/50 ; 70/30. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0.75%), suivi en fonction du temps d'incubation (24heure) à une température de 25 °C207

Figure.3. Evolution du module de conservation G' en fonction de temps d'incubation (10 heure) agrégats de β lg a différents concentrations protéiques respectivement de 3%, 4%, 4,5% ; incubés en présence de GDL, à 25 °C.	208
Figure.4. Evolution du module de conservation G' en fonction de temps d'incubation (10 heures) agrégats de Glob a différents concentrations protéiques respectivement de 3%, 4%, 5%, 6% ; incubés en présence de GDL, à 25 °C	208
Figure.5. Evolution du module de conservation G' , G'' et le croisement entre G' et G'' en fonction du temps à 25 °C, pour des agrégats β lg de Glob, et le mélanges β lg/Glob de ratios 50/50, à une concentration protéique de 4,5%, incubé en présence de GDL, pendant 10 heures.	209
Figure.6. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH à 25 °C, pour des agrégats β lg de Glob, et des mélanges de différents ratios β lg/Glob, a une concentration protéique de 4,5%, incubé en présence de GDL, pendant 10 heures.....	209
Figure.7. Spectre mécanique (G' , G'' en fonction de la fréquence) des gels mixtes de différents ratios β lg/Glob chauffé simultanément à une concentration protéique de 4,5 %, en fin de gélification (après 10heures) à 25°C.....	210
Figure.8. Spectre mécanique ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) des gels mixte acides de β lg/Glob par voie 1 à une concentration de 4,5% en fin de cinétique de gélification à 25 °C, en fin de gélification (après 10heures) à 25°C.....	210
Figure.9. Spectre mécanique ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) des gels mixte acides de β lg / Glob (préparés à base des agrégats chauffé séparément, à une concentration protéique de 4,5 % et en fin de cinétique de gélification à 25 °C.....	211

Table des matières

Introduction	2
Chapitre I : Etude bibliographique	6
I.1. Les propriétés physico-chimiques et structurales des protéines	6
I.1.1. Les protéines de pois	6
I.1.1.1. Les globulines de pois.....	7
I.1.1.1.1. La légumine 11S	7
I.1.1.1.2. Les vicilines 7S	9
I.1.1.1.3. La convicine 7S	10
I.1.1.2. Les albumines 2S	10
I.1.1.3. Les acides aminés des protéines de pois	12
I.1.2. La β -lactoglobuline	13
I.1.2.1. Les acides aminés de la β -lactoglobuline	16
I.2. Fonctionnalisation des protéines	16
I.2.1. Type d'interactions.....	18
I.2.1.1. Liaisons hydrophobes	18
I.2.1.2. Liaisons hydrogène	19
I.2.1.3. Liaisons électrostatiques	19
I.2.1.4. Liaisons covalentes	20
I.2.2. Fonctionnalisation des protéines par agrégation thermique.....	20
I.2.2.1. Structure et conformation protéique	21
I.2.2.2. Impact des paramètres physicochimiques sur la formation d'agrégats.....	21
I.2.2.2.1. La température	21
I.2.2.2.2. Le pH	22
I.2.2.2.3. La force ionique	22
I.2.3. Mécanisme d'agrégation des protéines globulaires à pH neutre	23
I.2.4. Gélification des protéines globulaires	26
I.2.4.1. Gélification thermique	26
I.2.4.2. Gélification à froid	30
I.2.4.3. Agrégation et gélification des protéines en mélange induites par thermodénaturation.....	36
I.3. Objectifs et démarche scientifique	44
 Chapitre II : Matériels et méthodes	 49
II. Matériels et méthodes	49

II.1. Matériels	49
II.1.1. La farine de pois	49
II.1.2. L'isolat protéique de lactosérum	49
II.1.3. Réactifs chimiques utilisés	49
II.2. Méthodes	49
II.2.1. Préparation des fractions protéiques.....	49
II.2.1.1. Extraction des fractions protéiques de globulines de pois (Glob)	49
II.2.1.2. Extraction des fractions protéiques de la β -lactoglobuline (β lg).....	52
II.2.2. Préparation des solutions protéiques	54
II.2.2.1. Préparation des solutions protéiques natives (Solutions mères)	54
II.2.2.2. Préparation des agrégats solubles	54
II.2.3. Caractérisation des fractions protéiques natives et des agrégats solubles	55
II.2.3.1. Mesure de la teneur en matière sèche	55
II.2.3.2. Mesure de la teneur en matière minérale	55
II.2.3.3. Mesure de la teneur en protéine par dosage de l'azote total.....	55
II.2.3.4. Teneur en lipides extractibles par l'éther de pétrole.....	56
II.2.3.5. Solubilité des protéines en fonction du pH et de la force ionique.....	57
II.2.3.6. Concentration minimale de gélification thermique	57
II.2.4. Electrophorèse SDS-PAGE	58
II.2.4.1. Principe de la méthode	58
II.2.4.2. Mode opératoire.....	58
II.2.5. Analyse enthalpique différentielle.....	59
II.2.5.1. Principe de la méthode	59
II.2.5.2. Mode opératoire.....	60
II.2.6. La charge de surface ou le potentiel Zeta (ζ).....	61
II.2.6.1. Principe de la méthode	61
II.2.6.2. Mode opératoire.....	62
II.2.7. Détermination de la quantité de thiols libres (S^-) et de ponts disulfures (SS)	63
II.2.7.1. Principe de la méthode	63
II.2.7.2. Mode opératoire.....	63
II.2.8. Détermination de l'hydrophobicité de surface des solutions protéiques	64
II.2.8.1. Principe de la méthode	64
II.2.8.2. Mode opératoire.....	64
II.2.9. Détermination de la taille des particules par DLS	65
II.2.9.1. Principe de la méthode	65
II.2.9.2. Mode opératoire.....	66
II.2.10. Détermination de la distribution des tailles des particules par SEC-HPLC	66

II.2.10.1. Principe de la méthode	66
II.2.10.2. Mode opératoire.....	67
II.2.11. Formation et caractérisation des gels à froids.....	68
II.2.11.1. Diagramme d'état sol-gel	68
II.2.11.2. Capacité de rétention d'eau des gels (Cre)	69
II.2.11.3. Eude rhéologique des gels	69
II.2.11.3.1. Principe de la méthode	69
II.2.11.3.2. Mode opératoire.....	71
II.2.11.4. Eude de la structure des gels à froid par MCBL	72
II.2.11.4.1. Principe de la méthode.....	72
II.2.11.4.2. Mode opératoire.....	73
II.3. Analyse statistique	73
Chapitre III : Préparation et caractérisation des matières premières	75
III.1. Préparation et caractérisation de la globuline de pois	75
III.1.1. Méthode d'extraction	75
III.1.2. Composition physico-chimique et rendement d'extraction des protéines	76
III.1.3. Profils SDS-PAGE	77
III.1.4. Solubilité de Glob en fonction du pH et de la force ionique	79
III.1.5. Teneurs de Glob en S ⁻ et SS	81
III.1.6. Détermination de l'hydrophobicité et la charge de surface de la Glob	82
III.1.7. Propriétés thermiques de la fraction de globuline	84
III.2. Préparation et caractérisation de la β -lactoglobuline (β lg).....	86
III.2.1. Méthode de purification.....	86
III.2.2. Composition physico-chimique et rendement d'extraction de β lg	87
III.2.3. Profils SDS-PAGE de β lg	88
III.2.4. Solubilité de β lg en fonction du pH et de la force ionique	90
III.2.5. Teneurs de la β lg purifiée en S ⁻ et SS	91
III.2.6. Détermination de l'hydrophobicité et la charge de surface de la fraction purifiée de β lg	92
III.2.7. Propriétés thermiques des fractions purifiées de β lg	93
III.2.8. Détermination de la concentration minimale de gélification de β lg et Glob	95
III.3. Conclusion du chapitre.....	97
Chapitre IV : Formation et caractérisation des agrégats solubles	99
IV.1.Détermination du taux d'agrégats solubles	99
IV.2. Détermination de l'hydrophobicité de surface des agrégats solubles	101

IV.3. Quantification des liaisons covalentes formées dans les agrégats	105
IV.4. Détermination de la charge de surface des agrégats solubles	107
IV.5. Caractérisation des interactions intermoléculaires par SDS-PAGE	110
IV.5.1. Profil SDS-PAGE des agrégats solubles à une concentration de 2%.....	111
IV.5.1.1. Profils SDS-PAGE des agrégats solubles préparés à 5mM en NaCl	111
IV.5.1.2. Profils SDS-PAGE des agrégats solubles préparés à 100 mM en NaCl	117
IV.5.2. Profils SDS-PAGE des agrégats formés en présence d'agent thiol-bloquant	118
IV.5.3. Profils SDS-PAGE des agrégats issus de mélange de β lg et de légumine	119
IV.5.3.1. Purification des fractions de Globuline	119
IV.5.3.2. Profils SDS-PAGE des agrégats formés à partir de β lg et de légumine	121
IV.5. Propriété thermique des agrégats solubles	123
IV.6. Caractérisation de la taille des agrégats mixte par DLS	127
IV.6.1. Distribution de taille des agrégats formés à faible force ionique	127
IV.6.2 Distribution de taille des agrégats formés à une force ionique élevée (100 mM NaCl).....	131
IV.7. Caractérisation des agrégats mixte par chromatographie d'exclusion stérique	133
IV.8. Analyse SDS-PAGE des fractions agrégées à 5 mM NaCl	141
IV.9. Hypothèse de mécanisme d'agrégation des agrégats solubles mixtes	143
IV.10. Conclusion du chapitre.....	146

Chapitre V : Gélification à froid des agrégats solubles 148

V.1. Détermination du diagramme d'état sol/gel, et des concentrations de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) des mélanges β lg/Glob	149
V.2. Détermination de diagramme d'état sol/gel acide et concentrations minimales de gélification (C_{g_a}) des mélanges β lg/Glob	150
V.3. Propriétés de gélification à froid des agrégats protéiques	152
V.3.1. Cinétique de gélification à froid des agrégats protéiques	152
V.3.1.1. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et Glob seuls	152
V.3.1.2. Cinétique d'acidification des systèmes β lg/ Glob.....	154
V.3.2. Rhéologie dynamique à faible déformation des gels acides	156
V.3.2.1. Rhéologie des gels acides de β lg et de Glob seuls	157
V.3.2.2. Rhéologie des gels acides mixtes β lg/Glob	162
V.3.2.2.1. Rhéologie des gels acides mixtes formés à partir des protéines chauffées simultanément (voie 1)	162
V.3.2.2.2. Rhéologie des gels acides mixtes de β lg/Glob formés à partir de mélanges d'agrégats thermiques obtenus séparément (voie 2)	167
V.3.3. Capacité de rétention d'eau (C_{re}) des gels mixtes (β lg/Glob)	171

V.3.4. Etude de la microstructure des gels acides mixtes β lg/Glob par MCBL	173
V.4. Conclusion du chapitre	178
Conclusion générale et perspectives	180
I. Conclusion générale.....	180
II. Perspectives	187
Références bibliographiques	190
Annexe.....	207

Introduction

I. Introduction

L'évolution démographique accompagnée de l'urbanisation intense et la croissance économique rapide, ont tendance à augmenter la pression d'une façon spectaculaire sur la terre, l'eau et les ressources naturelles (**Barron, et al. 2007**). En conséquence, l'augmentation du niveau de vie dans les pays développés est associée à des modifications de consommation alimentaire, avec une préférence marquée pour les aliments d'origine animale au détriment du produit végétal. La grande majorité des protéines animales est utilisée pour la fabrication et la transformation alimentaire. Or, compte tenu du contexte démographique, et de la nécessité de revoir nos modes de vie, il devient urgent d'utiliser d'autres sources protéiques comme les protéines végétales dont le coût de production et l'impact environnemental sont considérées plus faibles, la durabilité meilleure et l'apport nutritionnel de bonne qualité (**Chaumet, et al. 2009**).

Au cours des dernières années, le soja représentait deux tiers de la consommation mondiale en protéines végétales (**USDA, 2014**). L'utilisation répandue de cette matière première végétale dans de nombreux produits alimentaires a éclipsé d'autres types de protéines végétales comme la protéine de pois. Les préoccupations des industriels du secteur alimentaire sont cependant en train de changer en faveur de sources végétales plus variées, dont les protéines de pois, afin de faire face au monopole des protéines de soja. Dernièrement, un fort intérêt a été porté aux protéines de pois (*Pisum Sativum* L) qui possèdent un fort potentiel dans l'approvisionnement alimentaire, grâce notamment à des rendements importants et à des prix attractifs (**Munialo, et al. 2014; O'Kane, et al. 2004b**). Cette source protéique est considérée comme une alternative aux protéines animales et aux protéines de soja (**Liang & Tang 2013; Messian, et al. 2013; O'Kane, et al. 2004a; Shand, et al. 2007**) en raison des propriétés techno-fonctionnelles (**Munialo, et al. 2014**), des qualités nutritives et non allergéniques de ces protéines végétales (**Gharsallaoui, et al. 2012**).

La qualité de ces protéines s'est maintenant beaucoup améliorée, grâce d'une part à une meilleure sélection des cultivars, et d'autre part à une meilleure maîtrise de leurs procédés d'obtention (**Boye, et al. 2010; Stone, et al. 2015**).

Néanmoins, sur le plan technologique, l'utilisation de protéines de pois est encore très peu développée dans les industries agroalimentaires comparativement aux protéines de soja. Le frein à l'utilisation de ces protéines comme ingrédient alimentaire est lié, d'une part à leurs

notes sensorielles caractéristiques de légumineuse très marquées (variables en fonction de leur origine botanique mais peu sensibles au procédé d'extraction) (**Heng 2005; Heng, et al. 2006**), et d'autre part, au manque de connaissances scientifiques et de savoir-faire (**Liang & Tang 2013; Shand, et al. 2007**).

Toutefois, les aptitudes des protéines de pois à texturer les aliments ne sont pas suffisamment documentées par rapport au soja ou de manière plus flagrante par rapport aux protéines laitières et sériques (**Cayot & Lorient 1998; Kinsella & Whitehead 1989**). La pression à l'échelle mondiale sur les coûts de ces deux matières premières « pivot » - pour ne citer qu'elles – suggèrent le besoin de plus en plus pressant de mettre au point des produits alimentaires mixtes. Ainsi, une substitution partielle des ingrédients fonctionnels issus de la production animale, et sans pour autant faire appel au soja, serait une voie possible pour concevoir des produits mixtes stables et également pour masquer les défauts aromatiques apportés par les protéines de pois.

L'utilisation de protéines de pois comme ingrédient couplé à une protéine sérique dans l'industrie agroalimentaire nécessite une étude approfondie sur la nature des interactions entre ces protéines de différentes sources. Notre étude repose sur la détermination des types d'interactions intermoléculaires mises en jeu lors de l'association possible entre globulines de pois et β -lactoglobuline, et leurs impacts sur les propriétés méso-structurales et texturales de gels mixtes.

Cette thèse s'inscrit dans cette problématique avec comme objectif premier l'étude des interactions entre ce couple protéine laitière / protéine végétale mises en jeu lors d'un traitement thermique dans différentes conditions expérimentales. En deuxième lieu, nous nous intéresserons à la formation d'hydrogels dits « à froid » formés à partir d'agrégats thermiques mixtes par acidification via le glucono- δ -lactone. Dans cette étude, nous avons retenu la β -lactoglobuline (β lg) qui est la protéine majoritaire du lactosérum et les globulines de pois (Glob) qui sont choisies comme protéines modèles de notre étude. Nous avons choisi de simplifier au mieux ce système mixte qui sera composé d'une protéine pure (la β -lactoglobuline) et du mélange de globulines issu d'une extraction au point isoélectrique, afin de mieux comprendre les interactions intermoléculaires entre ces deux types de protéines.

La stratégie adoptée consiste à réaliser la thermodénaturation des protéines en mélange afin de former des agrégats solubles à différentes forces ioniques et pour un milieu neutre. Le mécanisme d'association et les interactions moléculaires entre les différentes fractions protéiques lors de la dénaturation thermique seront évalués en fonction de la force ionique du milieu, de différents ratios massiques du couple protéique, de la taille et la distribution de taille des agrégats mixtes. Ces différentes informations permettront de cibler ensuite une application potentielle dans laquelle les agrégats mixtes étudiés pourront être utilisés pour générer des systèmes gélifiés « à froid » par voie acide. L'enjeu de cette partie est d'évaluer l'effet de l'agrégation du mélange de protéines et l'impact du ratio massique β lg/Glob sur les propriétés mécaniques et la structure de ces gels mixtes acides. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de la β -lactoglobuline pour modifier les propriétés méso-structurales de systèmes riches en globulines de pois lors de l'agrégation thermique et de la gélification acide de ces protéines.

Dans ce qui suit, nous présenterons d'abord les principales données de bases pour la compréhension du sujet dans la première partie **Etude Bibliographique (Chapitre I)** avant que l'approche utilisée ne soit détaillée dans la section **Objectif de l'étude**.

Dans la suite du document, une deuxième partie sera consacrée à la description des matériels et des méthodes utilisés au cours de la réalisation de ce travail (**Chapitre II : Matériels et des méthodes**). La partie expérimentale du manuscrit a ensuite été divisée en 3 chapitres (**Chapitre III** : préparation et caractérisation de la matière première ; **Chapitre IV** : formation et caractérisation des agrégats solubles ; **Chapitre V** : gélification à froid des agrégats solubles).

A la fin du manuscrit une dernière section sera consacrée aux conclusions sur l'agrégation et la gélification à froid de ce système mixte, et proposera également les perspectives scientifiques et applicatives de ce travail.

Etude Bibliographique

Dans ce chapitre, les propriétés physico-chimiques des protéines utilisées lors de ce projet seront présentées dans un premier temps. Dans un deuxième temps, les mécanismes d'agrégation de ces protéines ainsi que les facteurs influençant cette agrégation seront présentés. Enfin dans un troisième temps, des éléments sur les différents modes de gélification appliqués à ces protéines seront abordés.

I.1. Les propriétés physico-chimiques et structurales des protéines

I.1.1. Les protéines de pois

La composition protéique de la graine de pois varie en fonction de plusieurs facteurs, comme les conditions climatiques, les cultivars et le génotype (**Gueguen & Barbot 1988**). Les graines de pois contiennent généralement 20-25% de protéines sur une base de poids sec. Ces protéines représentent le deuxième constituant principal de la graine de pois après l'amidon. L'amidon représente environ 50% de la graine, les fibres 20% et un taux minoritaire de lipides 2,5% (**Tzitzikas, et al. 2006**). Comme toutes les protéines végétales, les protéines de pois peuvent être classées en fonction de leur solubilité. Les albumines sont considérées comme solubles dans l'eau, les globulines sont qualifiées solubles et extractibles en solution saline, les prolamines sont solubles dans des solutions hydroalcooliques et les glutélines partiellement solubles dans les solutions acides et alcalines (**Osborne, 1924**).

Dans la plupart des plantes dicotylédones, les fractions azotées d'origine protéique sont dominées par les globulines (7S/11S) qui représentent entre 65 et 80% de l'azote protéique total, tandis que le reste appartient aux albumines (2S) et quelques % sont attribués aux autres protéines insolubles (**Guéguen & Barbot, 1988 ; Tzitzikas, et al. ; 2006; Kimura et al., 2008**).

Afin de séparer les fractions protéiques, une procédure d'extraction est primordiale. Celle-ci est réalisée dans des conditions optimales de solubilité, en prenant en considération les facteurs de pH, salinité et température. D'une manière générale, cette opération est suivie d'une purification (dialyse ou ultrafiltration/diafiltration). Le type de membrane choisi pour la purification de la globuline de pois, son seuil de coupure, sa surface et le temps de filtration affecte l'efficacité de séparation et la qualité de l'isolat pur obtenu (**Boye, et al. 2010**).

Le choix du protocole d'extraction et de purification des globulines de pois doit être basé sur une purification douce afin de limiter les dégradations de la structure native des protéines (**Karaca, et al. 2011; Marcone, et al. 1998b**). Cependant, toutes ces étapes affectent sensiblement la qualité de la protéine et influencent par conséquent ses propriétés fonctionnelles (**Boye, et al. 2010 ; Tian, et al. 1999; Guéguen, et al. 1983 ; Fuhrmeister, et al. 2003 ; Shand, et al. 2007, Sun, et al. 2010**).

I.1.1.1. Les globulines de pois

Les globulines de pois (Glob) sont des protéines de réserve ; le rôle biologique de ces dernières est d'apporter les éléments nutritifs (azote, soufre et carbone) à la plantule lors de sa germination (**Tzitzikas, et al. 2006**).

Les globulines de pois sont généralement classées suivant leur coefficient de sédimentation : les viciline/convicine (7S) et légumine (11S) (**Barac, et al. 2010**). La composition en ces deux fractions majoritaires est affectée principalement par des facteurs génétiques ainsi que des changements d'environnement. Plusieurs études ont été menées sur différents géotypes de pois pour évaluer la variabilité de ces fractions (7S et 11S), où les auteurs estiment en grande partie que le rapport viciline/légumine fluctue entre 0,67 et 5 selon **Casey, et al. (1982)**, et entre 2 et 4 par **Tzitzikas, et al. (2006)**. Ce ratio est considéré comme un facteur déterminant pour la gélification thermique des protéines de pois et de soja (**O'Kane, et al. 2005; O'Kane, et al. 2004c**). Il est à noter que légumine 11S et vicilines 7S du pois peuvent présenter de vraies ressemblances avec les glycinines 11S et conglycinine 7S du soja, respectivement (**Kimura, et al. 2008; O'Kane, et al. 2004a**).

Comme la plupart des protéines globulaires végétales, les globulines de pois présentent chacune des structures quaternaires complexes, polydisperses en termes de taille, masse moléculaire et sous-unités constitutives.

I.1.1.1.1. La légumine 11S

Les légumine de pois ont une masse molaire de 360-410 kDa (**Gatehouse, et al. 1980; Marcone, et al. 1998a**). Elles sont constituées de monomères de 60 kDa, qui s'associent sous forme hexamérique à des pH entre 7 et 9. Chaque monomère de légumine est constitué de deux polypeptides acide α et basique β respectivement de 38-40 kDa et de 19-24 kDa, liés de manière covalente via un pont disulfure (**Croy et al., 1980a ; Tzitzikas et al.,**

2006). Les polypeptides basiques β de nature plutôt hydrophobe sont situés dans le cœur de la protéine, tandis que les polypeptides acides se trouvent à la surface de la protéine (**Gueguen 1989; Karaca, et al. 2011; Marccone, et al. 1998b**).

La structure très condensée des légumineuses serait liée à sa faible hydratation dans la graine (**Marccone, et al. 1998a**). **Plietz, et al. (1983)** avaient suggéré que l'ensemble des globulines 11S de légumineuse ont des structures quaternaires très similaires ; celles-ci adopteraient un modèle de structure trigonale bipyramidale. Un tel arrangement justifierait l'orientation des polypeptides α , plutôt hydrophiles vers l'extérieur et β , plutôt hydrophobes vers l'intérieur de la protéine oligomérique (**Figure.I.1.**). Ce modèle semblerait plus adapté que celui de deux hexagones empilés (**Marccone, et al. 1998a**).

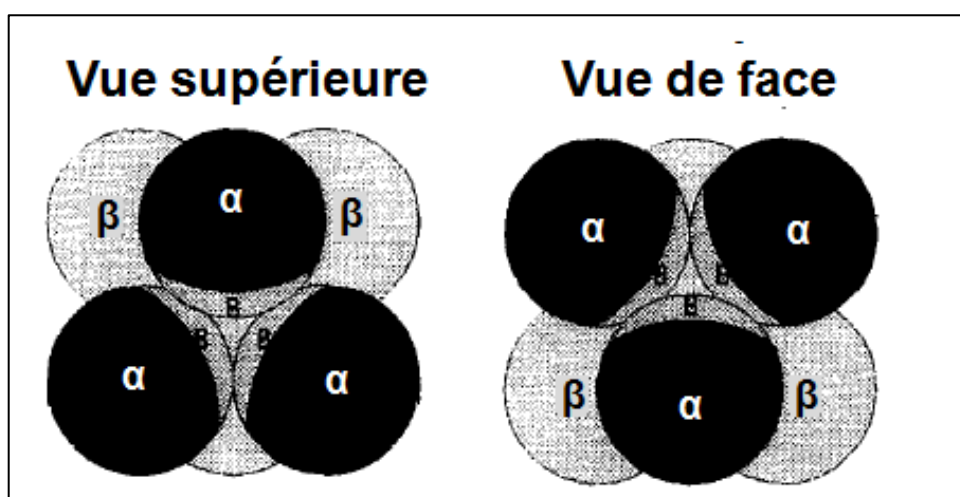


Figure.I.1. Modèle de la structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère comporte un polypeptide acide α et basique β , constitutifs des sous-unités de légumine (**Marccone, et al. 1998a**).

Selon les auteurs, les points isoélectriques (pI) des légumineuses de pois varient suivant les sous-unités : α : 4,5-5,8 et β : 6,22-8,00 (**Casey 1979; Matta, et al. 1981**). Au final, la valeur moyenne de pI de celles-ci se situe autour de 4,8-4,9. La variabilité de ce pI affecte la solubilité de la protéine ; cela peut s'expliquer par le comportement des sous-unités de légumine vis-à-vis des conditions environnementales (pH du milieu, la présence ou non de sel dans le milieu). **Gueguen, et al. (1988)** ont signalé qu'à pH 7 et en fonction de la force ionique (inférieure à 0,05 M NaCl), la légumine native s'agrège d'une façon réversible. Une

augmentation de la force ionique au-dessus de 0,05 M NaCl conduirait à la dissociation des unités vers l'état original. Il a été reporté que la légumine peut se dissocier en trimère puis en monomère dans des pH extrêmes et en fonction de la force ionique (pH 2,8 à faible force ionique) (**Subirade, et al. 1992**). Ce changement d'état conduit à l'augmentation de l'hydrophobicité de surface de ces protéines (**Gueguen 1989; Subirade, et al. 1992**).

Les légumine se singularisent des vicilines par leur contenu en acides aminés soufrés; il a été recensé pour chaque monomère α - β de 60 kDa de légumine jusqu'à quatre méthionines et sept résidus cystéine (**Croy, et al. 1980ab**), tandis que (**Casey, et al. 1981**) ont estimé ce nombre à respectivement deux et trois résidus par monomère, alors que les vicilines seraient dépourvues d'acides aminés soufrés. Comparativement à la légumine, la glycinine du soja contiendrait jusqu'à huit résidus cystéine (**O'Kane, et al. 2004**).

I.1.1.1.2. Les vicilines 7S

Les vicilines de pois 7S sont des protéines glucosylées ayant une teneur élevée en acide glutamique, aspartique et lysine mais totalement dépourvue de cystéine (**Gatehouse, et al. 1981**). Les sous-unités de viciline de pois présentent de fortes ressemblances structurales avec la β -conglycinine de soja; elles possèdent une région interne et une région d'extension N-terminale hautement chargée (**O'Kane, et al. 2004b**).

Ces polypeptides sont des trimères avec une masse molaire variant de 150-200 kDa; les différentes sous-unités proviennent d'un même précurseur de 50 kDa (**Croy, et al. 1980b ; Gatehouse, et al. 1982**). Les vicilines sont principalement constituées de sous-unités de 47-50 kDa, et d'autres polypeptides de plus faible poids moléculaire de 35, 33, 30, 19, 14, 12 kDa qui proviennent de protéolyses *in vivo* du précurseur de 50 kDa (**Tzitzikas, et al. 2006**). Les sites possibles de clivage du précurseur de 50 kDa sont au nombre de deux, dénommés α : β et β : γ (**Matta et al., 1981 ; Tzitzikas et al., 2006**). Lorsque les clivages se produisent sur les deux sites, des fragments de 20 kDa (α), 13 kDa (β), 12-16 kDa (γ) sont obtenus (**Figure.I.2**). Lorsque le clivage se produit entre α et β , les fragments résultants sont de 20 kDa (α) et 25-30 kDa (β + γ), alors qu'un clivage entre β et γ donne des fragments de 30-36 kDa (α + β) et 12-16 kDa (γ) (**Gatehouse, et al. 1982**). Cette famille de protéines est plus hétérogène, ce qui rend sa structure difficile à définir. La protéine semble organisée sous forme pseudo-hexagonale (**Gatehouse, et al. 1981**). Malgré l'hétérogénéité de ce polypeptide, le pI se situe généralement entre 4,6-4,8.

I.1.1.1.3. La conviciline 7S

La conviciline appartient également à la famille des globulines 7S ; elle est considérée comme la troisième famille de globulines de pois. Ces fractions protéiques ont une composition globale en acides aminés homologue à celle des vicilines. Ce polypeptide est constitué de sous-unités de 71 kDa associées en trimère à un poids moléculaire de 210-290 kDa (**Barac, et al. 2010**). Le sujet du clivage post-synthèse des convicilines reste controversé dans la littérature ; **Tzitzikas, et al. (2006)** ont reporté l'absence de ce clivage pour ces polypeptides tandis que cette caractéristique a été confirmée par **Croy et al. (1980)**. Contrairement à la viciline, la conviciline contient un résidu de cystéine et un résidu de méthionine par sous-unité (**Croy, et al. 1980; O'Kane, et al. 2004a**).

I.1.1.2. Les albumines 2S

En ce qui concerne la fraction « soluble dans l'eau » des albumines de la graine de pois mature, on distingue la PA₁ et la PA₂ majoritairement, puis minoritairement des lectines et inhibiteurs de protéases qui sont impliquées dans des mécanismes de défense (**Croy, Hoque, Boutler & Gatehouse, 1984**). La fraction albumine 2S est très hétérogène en composition et généralement de faible masse moléculaire, comprise entre 5 et 55 kDa. Les albumines sont composées principalement d'une fraction majoritaire PA2 (environ 5-10% du total des protéines de la graine de pois), qui est un homodimère de polypeptides de 26 kDa ou 25 kDa ; chaque sous-unité possède trois résidus de cystéine, dont deux forment un pont disulfure. La deuxième fraction est le PA1 de 11 kDa composée de deux polypeptides de 5-6 kDa (**Gatehouse, 1985**). Cette petite fraction est exceptionnellement riche en soufre ; elle contiendrait 50% des acides aminés soufrés totaux des protéines pois (**Higgins, et al. 1986**). Dans le cadre de notre étude, nous avons éliminé cette fraction protéique (Albumine) lors de l'étape d'extraction des protéines de pois afin de limiter nos interactions uniquement entre les Glob et la protéine sérique β -lactoglobuline, et de simplifier la compréhension des mécanismes d'interactions qui ont lieu dans nos systèmes d'études. Les différentes fractions protéiques de pois sont schématisées dans la **Figure.I.2**.

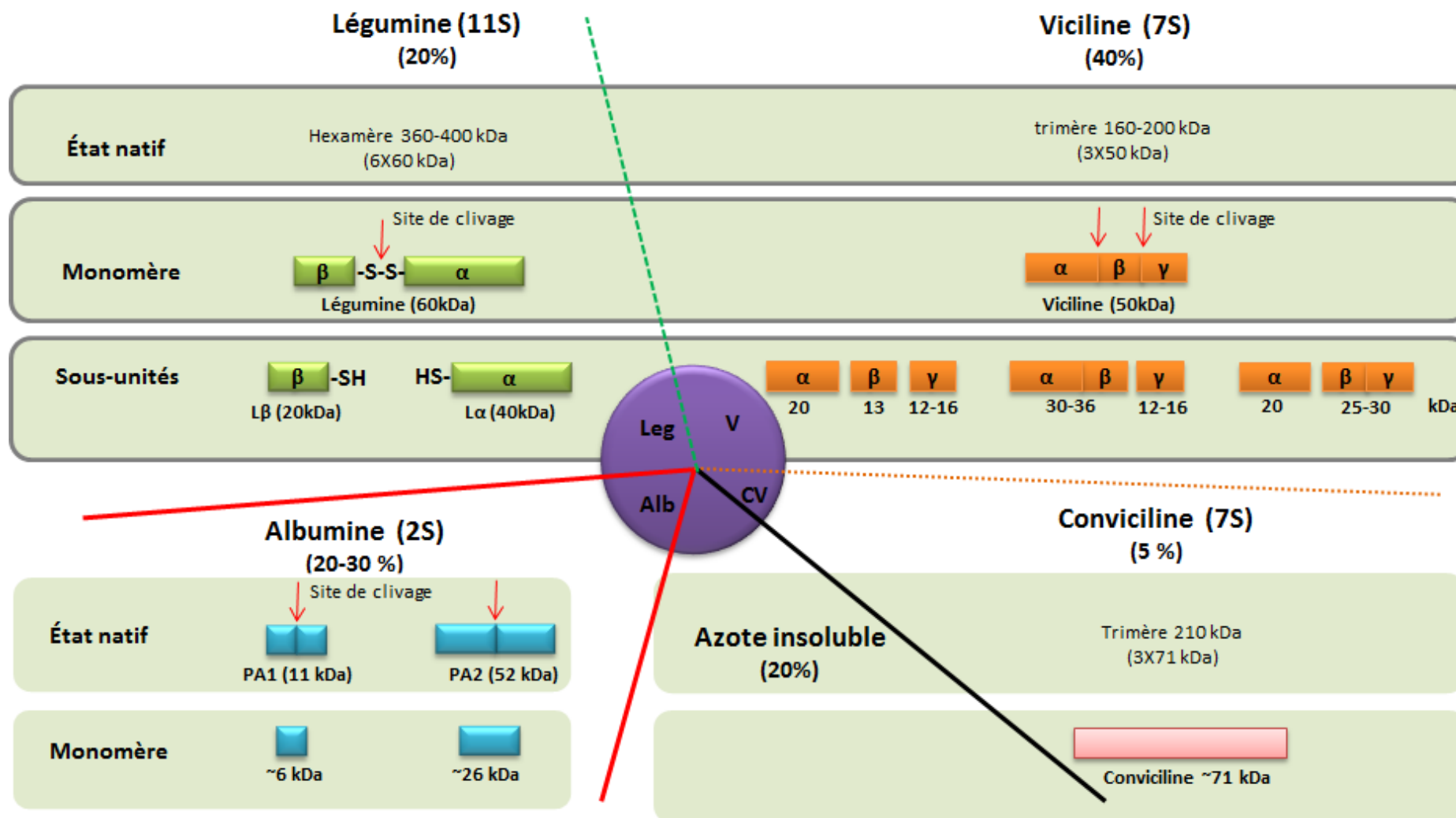


Figure.I.2. Composition et structure des principales fractions de protéines de pois, et assemblage des sous-unités constitutives des globulines de pois 7S et 11S, et potentiels sites de clivage (d'après Croy et al., 1980 ; Gatehouse et al., 1979, 1981 ; Tzitzikas et al., 2006).

I.1.1.3. Les acides aminés des protéines de pois

Les légumineuses présentent un profil protéique riche en acides aminés essentiels (lysine, isoleucine, acides glutamique et aspartique, arginine)(Savage & Deo 1989). Cependant les protéines correspondantes sont pauvres en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) et en tryptophane par rapport à la protéine animale (Bergh 1952; Shewry & Casey 1999). Le **Tableau.I.1.** présente la composition moyenne des acides aminés dans les fractions séparées 11S et 7S de pois et de 11S (glycinine) et 7S (conglycinine) de soja. Les valeurs ont été obtenues de la littérature (Boye, et al. 2010; Derbshyre, et al. 1976; O’Kane 2004; Rangel, et al. 2003; Savage & Deo 1989).

Tableau.I.1. Composition moyenne en acides aminés des fractions protéiques du pois et du soja pour cent gramme de protéine.

Acides aminés	Protéines de pois		Protéines de soja	
	Légumine 11S	Vicilines 7S	Glycinine 11S	Conglycinine 7S
<u>Essentiel</u>				
Thréonine	3,4±0,1	3,4±0,6	1,3±0,0	1,3±0,1
Valine	4,7±0,3	5,1±0,8	4,3±0,9	3,4±0,2
Méthionine	0,6±0,1	0,5±0,2	1,1±0,1	0,9±0,2
Isoleucine	4,8±2,2	5,1±0,1	4,3±0,9	3,8±0,1
leucine	7,8±0,3	9,1±0,1	11,7±5,5	5,3±0,6
Tyrosine	2,5±0,7	2,7±0,6	3,1±0,4	3,1±0,4
Phénylalanine	4,1±,7	6,1±0,1	7,7±3,2	6,2±0,7
Lysine	4,8±0,3	7,3±1,1	6,6±2,9	7,7±1,0
Histidine	2,6±0,2	2,4±0,5	1,7±0,4	1,9±0,4
Arginine	1,25±0,2	6,9±0,8	6,1±1,4	9,1±0,5
Tryptophane	0,8±0,4	0,1±0	0,7±0	0,1±0,1
<u>Non essentiel</u>				
Cystéine	0,7±0,1	0,1±0	1,8±0,5	1,1±0,1
Proline	5,0±0,6	4,0±0,9	7,6±1,4	7,3±0,2
Acide aspartique	12,1±0,6	12,0±0,0	9,0±4,4	8,8±1,5
Serine	5,9±1,0	6,2±0,7	5,8±1,7	7,9±0,1
Acide glutamique	19,6±2,1	18,5±1,3	16,2±0,5	22,1±2,3
Glycine	6,2±2,0	3,7±1,1	5,3±1,4	5,8±0,4
Alanine	5,5±1,2	3,7±1,2	5,7±0,3	5,5±0,1

Les acides aminés présentés en caractère gras dans le tableau, sont des acides aminés hydrophobes (Alanine, Phénylalanine, Valine, Isoleucine, Isoleucine, Valine), et les acides aminés soufrés (Méthionine, Cystéine). Il semblerait que les proportions en acides aminés des globulines de pois sont assez similaires à celles des globulines de soja. On peut noter la contenance faible en acide aminés soufrés des globulines de soja et encore plus faible des globulines de pois, tel que rapporté par **O’Kane (2004)**.

Il a été rapporté que dans les globulines (7S et 11S) de légumineuses, les séquences en acides aminés sont similaires ; par contre, la composition de ces acides aminés est variable d’une espèce à l’autre (**Kimura, et al. 2008**) et fonction du cultivar et des conditions environnementales, ainsi que fonction du mode d’extraction des protéines (**Stone, et al. 2015**).

I.1.2. La β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline (β lg) est une protéine globulaire animale (laitière), elle est présente dans le lait des mammifères à l’exception de chamelles, des primates et des rongeurs. Dans le lait de vache, sa concentration varie entre 2 et 4 gramme par litre (**Cayot & Lorient 1998**). Suite à une précipitation acide des caséines du lait (processus de transformation technologique), le lactosérum est obtenu. Il comprend différentes fractions protéiques : la β -lactoglobuline (β lg) (44-70%), l’ α -lactalbumine (α -la) (14-22%), le sérum albumine bovine BSA (1-5%) et des immunoglobulines (Ig) à l’état de traces (**Nicolai, et al. 2011; Ryan, et al. 2012**). Au niveau de l’industrie agroalimentaire, cette protéine a été largement utilisée surtout comme agent texturant, émulsifiant, gélifiant et encapsulant (**De Wit 1998; Nicolai, et al. 2011; Ryan, et al. 2013**).

Le rôle biologique de β lg n’est pas clairement établi. Au vu de l’affinité de cette protéine *in vitro* vis-à-vis de certaines molécules, elle servirait probablement à l’état natif comme transporteur *in vivo* d’acides gras, vitamines (A, D) et rétinol au cours de la digestion (**Li, et al. 1990; Sawyer & Kontopidis 2000**). Elle stimulerait l’activité des lipases prégastriques des ruminants (**Perez, et al. 1992**). Par rapport à la protéine de pois, la β -lactoglobuline a fait l’objet d’un nombre très considérable d’études ; c’est pour cette raison que nous nous limiterons à présenter seulement les principaux paramètres physicochimiques et la structure de cette protéine.

La séquence secondaire de β lg comporte 10-15% d'hélices α , 43-50% de feuillets β , et 15 à 20% de coudes β . Elle est composée de 162 acides aminés, son poids moléculaire est ~ 18 kDa ; elle possède deux pont disulfures au niveau des cystéines (C106-C119 et C66-C160) et une cystéine libre (C121) (Brownlow, et al. 1997; McKenzie, et al. 1972; Sawyer, et al. 1998). Cette cystéine libre est responsable de la formation des liaisons covalentes type (SS) et de la saveur du lait chauffé (Creamer, et al. 2004; Hambling, et al. 1992; Hoffmann & van Mil 1997). Le brin I (schématisé dans la Figure.I.3.) est impliqué dans la formation de dimères de β lg par interactions parallèles avec son homologue voisin.

En fonction de la variation des espèces animales, sept variants génétiques de structures primaires voisines ont été recensés. Les variant A et B sont les plus courants ; ils sont en ratios similaires dans le lait vache et ne diffèrent que par deux substitutions dans la structure primaire : Aspartate et Valine pour le variant A au lieu de la Glycine et l'Alanine pour le variant B (Fox 2003).

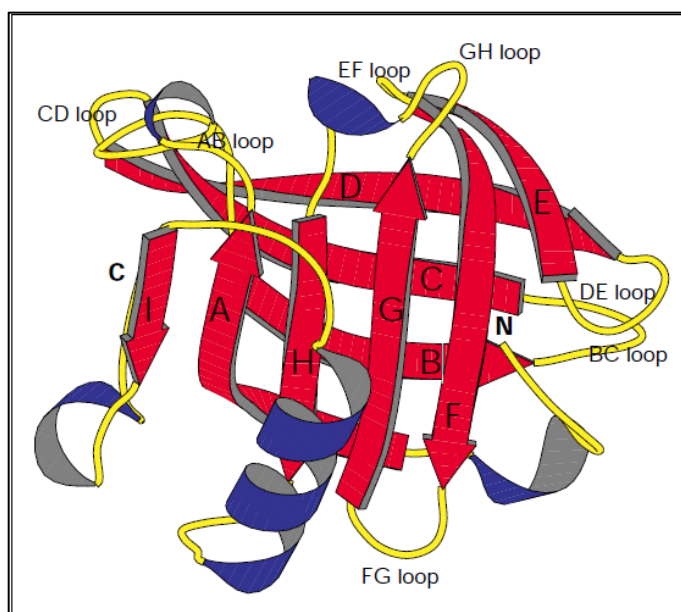


Figure.I.3. Modèle de structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline en solution aqueuse selon (Brownlow, et al. 1997).

La structure en calice de la β -lactoglobuline (β lg) (Figure.I.3.), lui permet son appartenance à la famille des lipocalines. Le monomère est formé par neuf feuillets β antiparallèles et enroulés dont huit forment le cœur de la molécule (une cavité centrale hydrophobe) (Brownlow, et al. 1997).

La β lg possède différentes formes de structure quaternaire qui se traduit par plusieurs stades d'oligomérisation en fonction des conditions environnementales (pH, force ionique, concentration protéique, température). Ces paramètres peuvent modifier les proportions de monomère, dimère et octamère. Ces changements de structure ont été établis par RMN aux différents stades d'association des monomères de β lg (**Hambling, et al. 1992**). La structure quaternaire est maintenue par des liaisons électrostatiques, et l'effet hydrophobe est l'un des facteurs principaux dans l'association des monomères.

A une température ambiante et pH neutre, la protéine existe principalement en équilibre de un dimère et un monomère. Entre pH 3 et pH 7,5 et à température ambiante, la β lg se présenterait en dimères via des liaisons hydrogènes (**Creamer, et al. 1983**). A une concentration supérieure à 1,5%, et à une température basse de 0-4 °C, un octamère serait formé par la tétramérisation de dimères (**Townend, et al. 1960**).

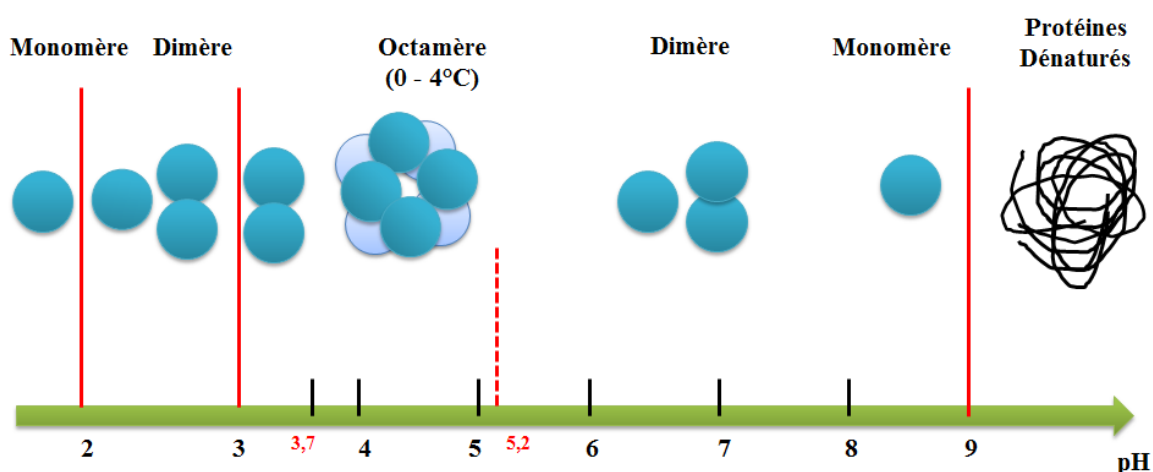


Figure.I.4. Etats polymériques de la β lg en solution aqueuse en fonction du pH selon (**Hambling, et al. 1992**).

Aux pH extrêmes, au-delà de 7,5 et en-dessous de 2, les dimères de β lg se dissocient en monomères par l'augmentation de la charge nette et de l'augmentation des forces répulsives qui en résulte. A un pH supérieur à 8, un changement conformationnel irréversible survient et conduit à une dissociation en monomère, puis à une dénaturation qui aboutit à l'agrégation irréversible de ces protéines pour un pH supérieur à 9 (**Hambling, et al. 1992**). Le point isoélectrique (pI) de la β lg avoisinerait une valeur de 5,2 (**Renard & Lefebvre 1992**).

I.1.2.1. Les acides aminés de la β -lactoglobuline

L'étude bibliographique concernant la β lg a mis en valeur que cette protéine est riche en acides aminés soufrés, qui lui procure son intérêt nutritionnel. La composition de β lg en acides aminés est présentée dans le **Tableau.I.3**. Les acides aminés figurant en gras sont des acides aminés de chaîne latérale non polaire (hydrophobe).

Tableau.I.2. Composition moyenne en acides aminés de la β -lactoglobuline (**Gordon, et al. 1961; Stein & Moore 1949**).

Acides aminés	Pour cent gramme de protéine
<u>Essentiel</u>	
Thréonine	4.95±0,03
Valine	5,62±0,01
Méthionine	3,22±0,02
leucine	15,5±0,11
Isoleucine	5,86±0,04
Tyrosine	3,64±0,01
Phénylalanine	3,85±0,16
Lysine	12.58±0,15
Histidine	1,63±0,03
Arginine	3,07±0,04
Tryptophane	1.49±0,12
<u>Non essentiel</u>	
Cystéine	3,49±0,13
Proline	5,29±0,15
Acide aspartique	11,52±0,11
Serine	3,96±0,13
Acide glutamique	19,08±0,14
Glycine	1.39±0,01
Alanine	1,31±0,02

D'après le **Tableau.I.2.**, il apparaît que cette protéine est plus riche en cystéine, méthionine et tryptophane que les Glob de pois.

I.2. Fonctionnalisation des protéines

Les protéines globulaires (notamment animales) possèdent de nombreuses propriétés physicochimiques et fonctionnelles (solubilité, pouvoir gélifiant, capacité moussante et émulsifiante) qui sont largement utilisées (dans une moindre mesure pour les protéines végétales) dans le domaine agroalimentaire, ainsi que dans d'autres secteurs développant des

applications à base de ces protéines (biomédicale, cosmétique). Cependant, afin d'améliorer ces propriétés pour le même type de protéine, certaines modifications de structure ont été proposés, notamment par : (i) l'application de différents traitements physicochimiques (changement de pH, pression et température élevée) pouvant conduire à la modification de la conformation de la protéine globulaire; (ii) l'ajout d'agents chimiques pouvant modifier les groupements fonctionnels (carboxyle, thiol, amine) de cette protéine; (iii) par une hydrolyse enzymatique qui peut modifier la conformation de cette protéine par une diminution de la taille des chaînes polypeptidiques. Il est à noter que ces modifications peuvent améliorer certaines propriétés telles que l'hydrophobicité, la capacité de gélification et les propriétés moussantes des protéines (**Adler-Nissen & Olsen 1979; Kunugi & Tanaka 2002; Venir, et al. 2010**).

Les protéines globulaires végétales y compris les globulines de pois présentent une structure particulièrement compacte et très enroulée (**Marccone, et al. 1998a**). Cela nécessite un chauffage prolongé à des températures élevées afin de les fonctionnaliser notamment par exposition des résidus hydrophobes conduisant dans certains cas à l'augmentation de l'aptitude fonctionnelle de ces protéines (gélification thermique, émulsification et moussage) (**Fuhrmeister & Meuser 2003; Kimura, et al. 2008**). Il est à noter également que l'utilisation d'hydrolysats de protéines végétales obtenus par protéolyse enzymatique peut améliorer les fonctionnalités des Glob de pois (**Schwenke, et al. 2001**). D'autres stratégies mettant en œuvre des mélanges de protéines ont été étudiées, afin de renforcer les propriétés fonctionnelles d'un biopolymère et/ou de bénéficier d'un effet synergique entre ces protéines, après leur traitement dans des conditions physicochimiques imposées (**Beliciu & Moraru 2011; Guyomarc'h, et al. 2009**).

Concernant les globulines de pois, plusieurs travaux ont été réalisés sur la fonctionnalisation de ces protéines par le changement des facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques afin d'influencer leurs propriétés fonctionnelles (**Barac, et al. 2010; Karaca, et al. 2011**). Les auteurs en grande partie jugent que les qualités technofonctionnelles des protéines de pois sont inférieures à celles des protéines de soja notamment en ce qui concerne le pouvoir gélifiant (**O'Kane, et al. 2004c; Shand, et al. 2007**). La fonctionnalisation des protéines par thermodénaturation implique l'intervention de plusieurs facteurs intrinsèques (spécifique à la nature de la protéine) et/ou extrinsèques (pH, force ionique, concentration protéique, température de dénaturation et durée d'incubation) qui peuvent influencer la nature des interactions entre les protéines.

Nous nous attacherons dans ce qui suit à décrire les différentes interactions susceptibles d'intervenir entre les protéines, les différents paramètres influençant ces interactions lors du traitement thermique, et l'impact de ces interactions sur la formation des agrégats de β lg et de Glob.

I.2.1. Types d'interactions

Les interactions entre les macromolécules sont classées généralement en 4 groupes (**Tolstoguzov 1997**) : soit des liaisons entre groupements moléculaires chargés (ou liaisons entre des résidus acides ou basiques des chaînes latérales des macromolécules) ; soit des liaisons entre groupements polaires par liaisons hydrogènes ; soit entre groupes apolaires (interaction hydrophobe) ; soit par liaison covalente (type SS pour les protéines). Les principales interactions sont présentées dans la **Figure.I.4**.

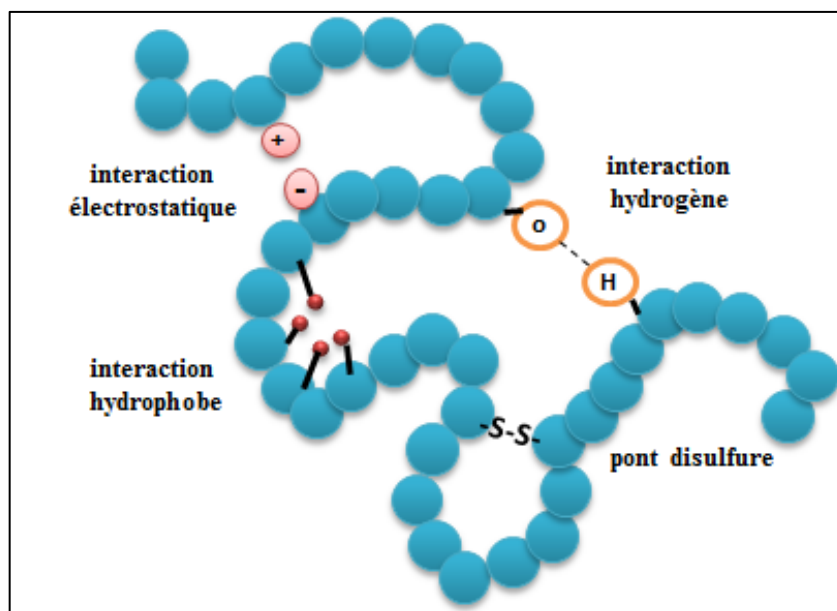


Figure.I.5. Liaisons susceptibles de se former entre les acides aminés des chaînes de protéines.

I.2.1.1. Interactions hydrophobes

Ce sont des interactions attractives de type endothermique, qui s'établissent entre les domaines apolaires lors de changement de conformation de la protéine après un traitement chimique ou physique, conduisant à l'association des zones hydrophobes. Ce type de liaison est favorisé par l'augmentation de la température. L'agrégation thermique de β lg à un pH neutre et à force ionique élevée (diminution des répulsions électrostatiques) est favorisée par

ce type de liaisons (**Baussay, et al. 2004; Galani 1999; Hoffmann & van Mil 1999; Schokker, et al. 2000**). Dans le cas de la dénaturation thermique de protéines de soja et de pois, la forte exposition des groupements hydrophobes favoriserait l'agrégation des protéines, ainsi que la gélification de ces systèmes à des concentrations protéiques élevées, quelque soient les conditions de force ionique et de pH (**Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010; Sun & Arntfield 2012; Tang, et al. 2009**).

I.2.1.2. Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont formées entre une paire d'électrons liée à un atome électronégatif (tel que l'oxygène), et un atome d'hydrogène sur un groupe voisin (par exemple $\text{O}-\text{H}^{\delta+}-\text{O}^{\delta-}$). Ces liaisons ne sont pas responsables de l'agrégation des protéines globulaires, mais elle jouent un rôle important dans la stabilisation de la structure formée (**Kinsella & Whitehead 1989**). Cette stabilisation a été observée après gélification acide de protéines de lactosérum et de soja, ainsi que pour les gels thermiques de Glob (**Cavallieri, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010**).

I.2.1.3. Liaisons électrostatiques

Les interactions électrostatiques sont des liaisons faibles. Ces interactions agissent entre les particules qui ont une charge électrique permanente, par exemple les dipôles ou les ions. Ces interactions peuvent être soit attractives ou répulsives en fonction des charges portées par les molécules ou les groupes chimiques ; lorsque les charges ont le même signe les interactions sont répulsives, tandis que pour des charges électriques opposées les interactions sont attractives. Cette liaison est très dépendante des conditions physicochimiques de milieu (pH, force ionique et nature des électrolytes) ainsi que de la température. L'augmentation de la température de chauffage et le temps d'incubation des protéines conduit à l'augmentation de ce type d'interactions (**Bryant & McClements 1998**). Généralement à un pH proche du point isoélectrique (pI) des protéines et/ou à une force ionique élevée, les répulsions électrostatiques entre les agrégats sont très faibles, dans ce domaine de pH et l'agrégation/gélification des protéines sériques se produit par d'autres liaisons non covalentes (**Alting, et al. 2002**).

I.2.1.4. Liaisons covalentes

Les interactions covalentes sont des liaisons chimiques très fortes ; elles proviennent du partage d'électrons entre deux atomes de la même molécule ou de deux molécules différentes. Pour la protéine globulaire, ce type de liaison existe entre deux parties du polypeptide sous forme de ponts disulfures réalisés entre les groupements thiols des résidus cystéine pour former des liaisons inter ou intramoléculaires (**Friedman 1973; Kinsella 1982**). Cette liaison peut se former par oxydation des thiols libres SH, ou par réactions d'échanges S⁻/SS, et est favorisée par un chauffage prolongé et par la présence de catalyseur (**Bouhallab, et al. 2004; Visschers & de Jongh 2005**). Lors d'un chauffage prolongé, les liaisons disulfures intramoléculaires se transforment progressivement en liaisons intermoléculaires (**Chaplin & Lyster 1986**).

En absence de sel, les interactions covalentes jouent un rôle crucial dans la stabilisation de la structure et la réticulation de la taille des agrégats de protéines sériques (notamment la β lg), ce qui conduit à la formation d'agrégats thermiques de structure dense possédant un diamètre réduit (**Renard & Lefebvre 1992; Schmitt, et al. 2007**). Ainsi, un rôle positif de ces liaisons sur les propriétés mécaniques des gels thermiques et acides de protéines de lactosérum est observé (**Alting, et al. 2004; Mounsey & O'Kennedy 2007**).

En ce qui concerne les protéines de soja et de pois, plusieurs études ont montré le rôle non négligeable de ces liaisons dans la stabilisation et le maintien de la structure des agrégats thermiques (**Mession, et al. 2013; Tang, et al. 2009**).

I.2.2. Fonctionnalisation des protéines par agrégation thermique

La dénaturation thermique des protéines conduit à l'association de ces dernières par une ou plusieurs interactions. Ces interactions, décrites ci-dessus, dépendent de différents facteurs (i) intrinsèques (la composition et la conformation de protéines) et/ ou (ii) des facteurs extrinsèques de nature physicochimique (force ionique, concentration protéique et pH). Des travaux antérieurs ont montré que la formation d'agrégats protéiques solubles peut être réalisée via la maîtrise et la modulation des paramètres physicochimiques, conduisant à la génération d'agrégats protéiques avec des propriétés structurales (diamètre et poids moléculaire) bien définies (**Schmitt, et al. 2007; Zúñiga, et al. 2010**).

I.2.2.1. Structure et conformation protéique

L'utilisation de protéine comme agent structurant/texturant nécessite une bonne compréhension des changements structuraux et de conformation qui pourraient se produire lors de la production d'agrégats. Les différents traitements physicochimiques peuvent provoquer la dénaturation et l'agrégation des protéines globulaires. De même, les propriétés de ces protéines sont liées à leur conformation et à leur structure.

L'augmentation de température au-dessus de la température de thermodénaturation des protéines provoque des changements profonds au niveau de leur structure, cela par rupture des différentes liaisons (hydrogène, hydrophobe, électrostatiques et Van der Waals) qui stabilisent les différents niveaux de structure (secondaire, tertiaire et quaternaire) de la molécule. A ce stade, le déploiement de la structure est observé avec l'exposition des groupements hydrophobes initialement enfouis dans le cœur de la protéine (**Relkin 1998**). La dénaturation thermique des globulines de légumineuse à des températures élevées (de l'ordre de 85 à 90°C) reflète bien l'état d'organisation de la structure très compacte de ces protéines (**Sun & Arntfield 2010; Tang, et al. 2009**).

La modification de la conformation des protéines peut être réalisée en jouant sur la température de chauffage/durée d'incubation ou les conditions physicochimiques du milieu. Ces modifications de conformation vont affecter par la suite la morphologie des agrégats et les caractéristiques macroscopiques du gel protéique (**Clark, et al. 2001**).

I.2.2.2. Impact des paramètres physicochimiques sur la formation d'agrégats

I.2.2.2.1. La température

La température de thermodénaturation et la durée d'incubation des protéines globulaires peuvent influencer l'agrégation de ces protéines. Plusieurs auteurs ont montré l'effet de la thermodénaturation des protéines globulaires (de soja et de lait) sur l'amélioration des propriétés texturantes des gels acides formés par rapport à ceux formés avec des protéines non dénaturées (**Campbell, et al. 2009; Lucey, et al. 1999; Perrechil, et al. 2013**).

Il a été montré par exemple que le chauffage lent (avec une rampe de l'ordre de 0,5-2 °C/ min) réduit la valeur de température de thermodénaturation du fait d'un déploiement très progressif de la structure des Glob de pois (**Sun & Arntfield 2011**).

Une thermodénaturation prolongée des protéines de lactosérum (90 °C pendant 30 min), conduit à la formation de gels acides forts avec des propriétés mécaniques améliorées **(Bryant & McClements 2000; Ju & Kilara 1998; McClements & Keogh 1995)**.

Concernant les mélanges formés de protéines laitières et de protéines de légumineuse thermisées simultanément (protéines de soja/caséine, Glob de pois/caséines), une augmentation de la stabilité thermique des protéines de légumineuse en présence de caséine dans le mélange a été constatée. Cela peut être attribué à l'effet d'encombrement stérique imposée par la caséine dans le mélange, qui limite la mobilité moléculaire et la flexibilité de la glycine ou de la légumine, affectant par la suite le déplissement de ces fractions **(Beliciu & Moraru 2011; Messin, et al. 2015b)**.

I.2.2.2.2. Le pH

Le pH est un paramètre très important qui agit directement sur le degré d'ionisation des groupements des chaînes latérales des protéines. La variation de pH affecte sensiblement la charge des protéines, leur solubilité ainsi que la température de dénaturation de ces protéines globulaires. Par exemple, pour la β lg, la température de thermodénaturation à pH 8 est de 65 °C alors qu'elle est de 74 °C à pH 6,75 **(Qi, et al. 1995)**. Comme la plupart des protéines végétales, la conformation des Glob de pois dépend fortement du pH, et leurs propriétés fonctionnelles montrent une corrélation avec le changement de conformation **(Clark, et al. 2001; Tandang-Silvas, et al. 2010)**.

Les propriétés structurales et la morphologie des agrégats thermiques des protéines globulaires sont affectées par le pH : à un pH faible, des agrégats sphériques sont attendus, tandis qu'à un pH neutre et en absence de sel des agrégats linéaires seront formés à cause de l'augmentation des répulsions électrostatiques **(Damodaran 1996; Durand, et al. 2002)**.

I.2.2.2.3. La force ionique

La force ionique joue un rôle crucial sur la stabilité de la conformation des protéines globulaires en solution ; l'ajout modéré de sel réduit par écrantage des charges les répulsions électrostatiques, ce qui augmente la stabilité thermique de ces protéines. La force ionique détermine aussi le type des interactions impliquées lors de l'agrégation des protéines ; à une force ionique élevée les interactions hydrophobes inter- et intra-protéique sont favorisées entre les molécules **(Damodaran 1996)**.

Un haut niveau de répulsions (absence de sels, $\text{pH} \gg \text{pI}$) empêche l'agrégation rapide lors de l'exposition des zones hydrophobes, et les protéines globulaires dénaturées vont s'agréger de manière linéaire du fait de la balance répulsions électrostatiques /interactions hydrophobes. Par contre, à un pH faible et en présence de sel, l'agrégation est rapide lors de l'exposition des zones hydrophobes et les agrégats vont s'associer sous forme de particules sphériques (Clark, et al. 2001; Schmitt, et al. 2007).

I.2.3. Mécanisme d'agrégation des protéines globulaires à pH neutre

L'agrégation est l'étape qui succède à la dénaturation des protéines globulaires entraînant l'exposition des groupements hydrophobes et des fonctions thiols. Cette étape est dépendante de conditions externes donc le couple chauffage/temps d'incubation, du pH, de la force ionique et de la concentration protéique. A un pH supérieur au pI des protéines et à faible concentration en sel, la dénaturation et l'association de ces protéines génèrent des agrégats solubles. Le mécanisme d'agrégation de βlg est considéré comme un modèle d'étude pour la plupart des protéines globulaires (Baussay, et al. 2004; Clark, et al. 2001; Li, et al. 2007).

A température ambiante et à un pH neutre, la βlg existe sous forme d'un équilibre entre monomères et dimères. Dans les mêmes conditions de pH et de température, et en absence de sel, l'agrégation thermique de la βlg se fait généralement en trois étapes (**Figure.I.5.**) : dans un premier temps, le dépliement et la dissociation de la βlg en monomères réactifs s'opèrent, exposant ainsi les groupements thiols. Ensuite, les monomères s'associent irréversiblement via des liaisons disulfures intermoléculaires pour former des agrégats primaires. Ces derniers réagissent alors entre eux via des interactions covalentes (échanges SH/SS et S⁻/SS) et non covalentes (interactions hydrophobes) pour former des agrégats fractals (Galani 1999; Hoffmann & van Mil 1997).

Ces agrégats solubles s'agrègent ensuite pour former un réseau tridimensionnel (gel) si la concentration protéique est suffisante (concentration en protéine supérieure à la concentration minimale de gélification thermique).

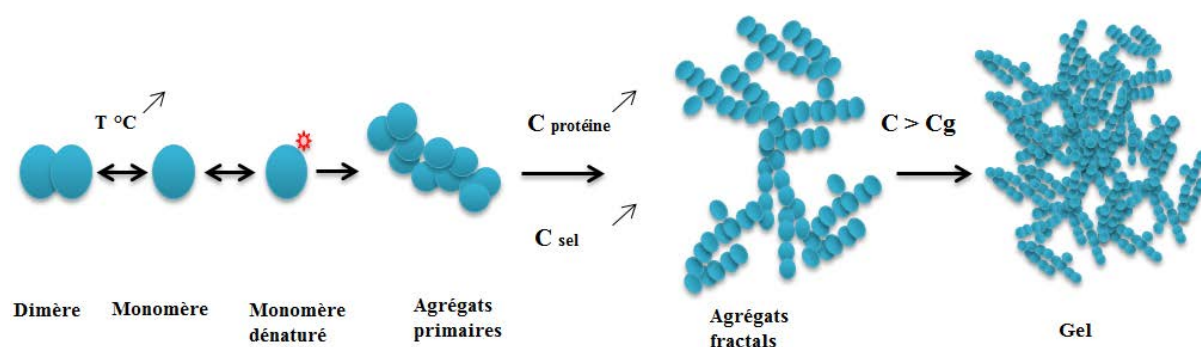


Figure.I.6. Modèle d'agrégation thermique en 3 étapes de la β -lactoglobuline (Aymard, et al. 1996; Le Bon, et al. 1999).

Plusieurs auteurs ont montré que la taille et le poids moléculaire des agrégats sont influencés par le pH, la force ionique et la concentration protéique. Par exemple à pH 7 et à une concentration protéique de 1,7% de β lg, le poids moléculaire des agrégats est de $1,6 \times 10^6$ kDa (Schokker, et al. 1999). A la même concentration protéique et à pH 2,5, la formation d'agrégats très larges est observée avec des masses moléculaires pouvant atteindre 10^7 kDa (Schokker, et al. 2000).

Des agrégats de β lg ont été formés à pH 7 et en absence de sel. Ces agrégats étaient de petite taille, de faible poids moléculaire et présentaient une hydrophobicité de surface élevée. Ces caractéristiques structurales leur ont conféré notamment des propriétés tensioactives révélées par l'amélioration de la stabilité des mousses (Schmitt, et al. 2007).

Les différentes caractéristiques méso-structurales de ces agrégats (poids moléculaire et taille des particules) sont liées à la nature des interactions intermoléculaires impliquées entre les protéines lors du chauffage (Bryant & McClements 1998).

A haut niveau de répulsions électrostatiques (absence de sel) (Figure.I.6.), les liaisons covalentes sont favorisées et leurs implications conduisent à la réduction de la taille des agrégats (Hoffmann & van Mil 1997; Schmitt, et al. 2007; Zúñiga, et al. 2010).

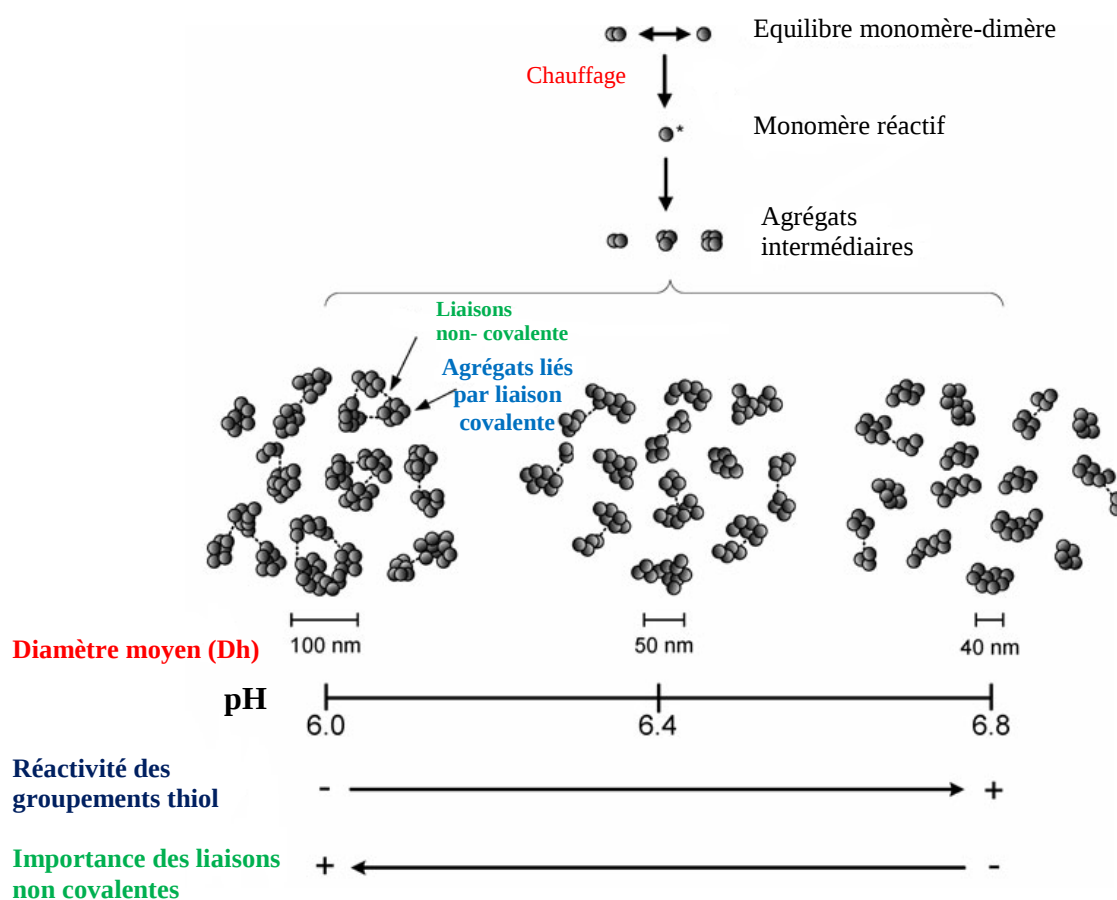


Figure.I.7. Proposition de mécanisme pour la formation d'agrégats de β -lactoglobuline et type de liaisons en fonction du pH (Zúñiga, et al. 2010).

En revanche, des gros agrégats (diamètre important et haut poids moléculaire) sont formés à une force ionique élevée par l'implication accrue de liaisons non covalentes (Verheul, et al. 1998). A pH 7 et à force ionique élevée (de l'ordre de 0,2 M NaCl), l'augmentation du poids moléculaire des agrégats se traduit par l'augmentation de la densité locale des agrégats qui est dépendante de la force ionique (Baussay, et al. 2004).

En ce qui concerne l'agrégation des Glob de pois, celle-ci est similaire à celle des autres protéines végétales, qui suivent le même modèle séquentiel d'agrégation que β lg (Li, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010).

Le chauffage prolongé des Glob de pois (de 85-90 °C) provoque l'exposition des acides aminés enfouis dans le cœur de la protéine native, ce qui affecte fortement les interactions intermoléculaires lors de l'agrégation (Kimura, et al. 2008). Les sous-unités dissociées (11S/7S) vont s'associer particulièrement via des liaisons non covalentes

(hydrophobes), et par l'intermédiaire d'échanges de liaisons covalentes (S⁻/SS) plus faiblement que dans le cas de la protéine sérique, mais suffisamment pour contribuer à la stabilisation de la structure des agrégats (Guo, et al. 2015; Messian, et al. 2013; O'Kane, et al. 2004a; O'Kane, et al. 2004c).

Messian, et al.(2013) ont étudié la dénaturation thermique des Glob de pois (à 8% m/m, à pH 7,2 et 100 mM NaCl, et à une température de chauffage de 90°C/60 min). La température de dénaturation des protéines a diminué de 4 °C en abaissant la vitesse de chauffage de 10 à 5 °C / min, ce qui confirme l'effet d'un chauffage lent sur le déplissement progressif de la structure de Glob de pois. L'agrégation de ces protéines était principalement gouvernée par des interactions non covalentes. La thermodénaturation de ces protéines en présence de NEM (20 mM) conduit à une légère modification du poids moléculaire de ces agrégats mesuré par SEC-HPLC par rapport de ceux chauffés sans NEM, tandis que le chauffage de ces protéines en présence de DTT a provoqué une précipitation des macroagrégats formés. Ces auteurs ont conclu que l'agrégation de Glob de pois est aléatoire, et la légumine joue un rôle important dans la stabilisation de la structure de ces agrégats.

La thermodénaturation des globulines végétales (sarrasin , soja, haricot) dans différentes conditions opératoires (de force ionique, de température de dénaturation) génère des macroagrégats de hauts poids moléculaires (jusqu'au 8×10^6 kDa) avec un diamètre apparent très important (200nm)(Choi & Ma 2006; Guo, et al. 2015; Mori, et al. 1982; Zheng, et al. 1993). Dans certains cas, la formation des macroagrégats est accompagnée d'une précipitation de la matière protéique sous forme de macroagrégats insolubles à force ionique élevée.

I.2.4. Gélification des protéines globulaires

I.2.4.1. Gélification thermique

La gélification des protéines globulaires est l'étape qui suit la thermodénaturation et l'agrégation de ces protéines. Si la concentration en protéines est suffisante (concentration protéique supérieure à la concentration minimale de gélification thermique $C_{g_{th}}$) les agrégats solubles vont s'agglomérer et former un réseau de gel. Ce dernier continue à se développer même au cours du refroidissement.

Le processus de gélification est dépendant de plusieurs paramètres comme la concentration protéique, la force ionique et le pH. En fonction des conditions opératoires, on peut obtenir deux types de gels thermiques :

- Des gels fibrillaires (filamenteux) qui sont formés à un pH éloigné du point isoélectrique (pI) des protéines et à haut niveau de répulsions électrostatiques (force ionique faible). Ces gels sont caractérisés par un réseau homogène et une structure fine qui présente un aspect transparent ou translucide. Ce type de structure est dû à l'arrangement linéaire des sous-unités protéiques lors de l'agrégation thermique **(Bryant & McClements 1998; Totosaus, et al. 2002)**. En ce qui concerne les globulines végétales, il a été montré qu'à pH 7,6 et en absence de sel, les agrégats protéiques de soja s'agglomèrent en fibrilles d'une façon similaire à la β lg afin de donner un gel thermique **(Renkema 2004)**.
- Dans le cas des gels particuliers qui sont formés à une force ionique élevée (faibles répulsions électrostatiques), l'agrégation est accélérée conduisant à la formation d'amas protéiques sphériques et denses. Ces gels présentent un aspect opaque et une structure hétérogène caractérisée par une faible capacité de rétention d'eau et un module d'élasticité faible par rapport aux gels fibrillaires **(Nicolai & Durand 2013)**.

Afin de suivre la cinétique de gélification et d'évaluer les propriétés structurales des gels formés, plusieurs méthodes ont été utilisées dans la littérature : la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ou à Transmission (MET), la Microscopie Confocale à Balayage laser (MCBL) et la rhéologie aux faibles/grandes déformations. Dans ce qui suit, nous allons décrire brièvement les propriétés rhéologiques rapportées dans la littérature concernant les gels thermiques de β lg et de protéines de pois, et nous nous limiterons dans cette partie à la gélification à un pH très supérieur au pI.

Généralement pour les gels thermiques de β lg, le mode de chauffage et le temps d'incubation ainsi que la force ionique influent sur les propriétés rhéologiques de ces gels. Lorsque la concentration en protéines est supérieure à la concentration minimale de gélification, le module de viscosité (G'') augmente avec l'augmentation du module d'élasticité G' . Le module de viscosité peut être associé à la fraction du solvant qui contient à la fois des agrégats et des protéines non agrégés. Avec le temps, ce module (G'') se stabilise et devient négligeable par rapport à G' , ce qui correspond à l'incorporation des protéines dans

la formation du réseau macromoléculaire. Les gels thermiques de β lg sont forts et élastiques, et présentent une texture ferme (**Durand, et al. 2002; Le Bon, et al. 1999**).

L'augmentation de la température de chauffage accélère la cinétique de gélification pour différentes concentrations étudiées (25, 50, 76 g/l) et l'augmentation de la force ionique diminue sensiblement la $C_{g_{th}}$; la force de gel est dépendante de la concentration protéique selon différentes forces ioniques (0 et 100 mM NaCl)(**Pouzot, et al. 2004**).

En ce qui concerne les gels thermiques de protéines de légumineuse, **O'kane et al. (2004c)** ont étudié et comparé des gels thermiques de 11S de pois et 11S de soja formés à une concentration protéique initiale de 8,4% (m/v), à pH 7,6 et à force ionique élevée (0,2 M NaCl). Les échantillons ont été préchauffés à 45 °C pendant 15 min et ensuite chauffés à 115 °C à vitesse de 1°C/min. Cette comparaison concerne l'effet du refroidissement lent (0,5°C/min) et rapide (1°C/min) sur le comportement rhéologique des gels obtenus. Les auteurs ont observé une augmentation de la force de gel lors du refroidissement lent, alors que la rigidité est réduite avec l'ajout d'un agent de blocage des thiols (20 mM de N-éthylmaleimide, NEM). Cela indique que les sous-unités dissociées (par thermodénaturation) restent plus longtemps dans un état déplié et que les interactions intermoléculaires se poursuivent lors du refroidissement. L'élasticité des gels de globulines 11S de pois était inférieure à celle des globulines 11S de soja, ce qui s'explique par une participation plus faible de liaisons covalentes pour les protéines 11S de pois par rapport à celle des protéines 11S de soja ; ceci souligne le rôle de ces liaisons dans l'amélioration de l'élasticité des gels. Dans la même étude, les auteurs ont montré que le réseau de gel des globulines 11S de pois était plus sensible au réarrangement moléculaire après refroidissement, par rapport à celui de la globuline 11S de soja. Ces auteurs ont conclu sur l'instabilité relative du réseau de gel thermique de 11S de pois par rapport à celui de 11S de soja.

Plusieurs auteurs ont aussi indiqué que les gels thermiques de globulines 11S de pois sont plus faibles et présentent une élasticité moindre que dans le cas des globulines 11S de soja ; cela peut-être lié à la combinaison de plusieurs facteurs structuraux (teneur en acides aminés et la position des résidus...) (**Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2011**).

O'kane, et al. (2005) ont étudié la gélification thermique de 5 isolats commerciaux de protéines de pois (de différents cultivars) à une concentration protéique de 18% (m/v) et en absence de sel. Les propriétés rhéologiques des gels de différents cultivars étaient

dépendantes de leur teneur en cystéine ainsi que de leur capacité d'échange de liaisons disulfures lors du chauffage.

O'kane, et al. (2004a) ont montré que la teneur élevée en conviciline dans l'isolat protéique perturbe la consolidation du gel thermique lors du refroidissement. Cela probablement à cause de l'excès de répulsions électrostatiques générées par cette sous-unité, qui gêne les interactions attractives entre les protéines lors de la gélification.

Sun, et al. (2010 ; 2011) ont mis en évidence que la gélification thermique des protéines de pois à une force ionique de 300 mM NaCl et à pH 5,7 nécessite une concentration protéique de 5,5% pour l'isolat extrait au laboratoire et de 14,5% pour l'isolat commercial de pois. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont confirmé que le chauffage/refroidissement rapide lors du traitement thermique affaiblit les propriétés rhéologiques (à faible amplitude d'oscillation) des gels thermiques. Par contre, un chauffage progressif améliore la force et l'élasticité de ces gels. La force des gels est proportionnelle à la concentration protéique. Néanmoins, les interactions protéiques et le degré de réticulation du réseau gélifié augmente proportionnellement à la teneur en agrégats de pois générés sous l'effet du traitement thermique.

Sun, et al. (2012) ont mis en évidence que des ajouts élevés de NEM et de DTT (>50 mM) affaiblissent la force des gels, ce qui traduit un rôle modéré des échanges de ponts disulfures des sous-unités de légumine dissociées. L'ajout d'agents dissociants (SDS (10 mM), chlorure de guanidium et l'urée (>3M)) ont inhibé la gélification de Glob de pois. Les auteurs ont conclu sur le rôle primordial des interactions électrostatiques et hydrophobes dans la formation du réseau de gel.

Shand, et al. (2007) ont montré qu'un isolat commercial de protéines de pois peut former des gels thermiques à une concentration protéique de 19,6% (p/p) à un pH 7,1 et à 2% de NaCl avec des propriétés mécaniques faibles, tandis que dans les mêmes conditions opératoires les gels préparés à partir de Glob de pois extraites au laboratoire, présentent des gels plus forts et plus élastiques. Cela indique que l'isolat commercial de pois possède des propriétés fonctionnelles faibles à cause de sa dénaturation thermique lors du processus industriel.

I.2.4.2. Gélification « à froid »

La gélification dite « à froid » est une alternative à la gélification thermique ; celle-ci est utilisée pour former des aliments gélifiés à base de protéines végétales dont l'application la plus connue est le tofu. Ce mode de gélification se réalise par la diminution des répulsions électrostatiques entre protéines ou leurs agrégats, soit par l'augmentation de la force ionique en ajoutant des sels (en quantité modérée), soit par l'abaissement de pH (l'ajout d'un acidifiant ou de bactérie lactique) (**Bryant & McClements 1998**). La gélification thermique nécessite généralement des quantités élevées en protéines ou à défaut une concentration élevée en sel. La gélification à froid permet de minimiser la quantité de protéine engagée, et d'élargir des applications comme, par exemple, l'encapsulation de matière active sensible au traitement thermique (**Nicolai, et al. 2011**).

Pour obtenir ces gels à froid, deux étapes sont nécessaires. La première consiste à utiliser une solution de protéines natives préalablement chauffée à 70-90 °C pour une durée de 5 à 60 min afin de former des agrégats solubles à un pH neutre (loin du pI) et dans un milieu dépourvu de sel (ou inférieur à 50 mM NaCl), afin d'assurer le maximum de répulsions électrostatiques (**Hongsprabhas, et al. 1999; McClements & Keogh 1995**). La deuxième étape consiste à diminuer les répulsions électrostatiques dans le système (par abaissement de pH ou l'ajout de sel), et de travailler à une température ambiante (20-25 °C). Ce mode de gélification nécessite une concentration en protéines inférieures à la concentration de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) (**Totosaus, et al. 2002**).

Au-dessus du pI des protéines, l'ajout de sels aux agrégats solubles conduit à des interactions dipôle-dipôle avec les groupements carboxylates à la surface de ces agrégats. Les cations monovalents (Na^+ , K^+ ...) assurent un écrantage partiel ou total des charges négatives selon leur concentration. Les cations divalents (Ca^{++}) génèrent plus de force ionique à des concentrations plus faibles que les cations monovalents, ce qui permet la formation de ponts salins entre agrégats et la formation d'un réseau tridimensionnel stabilisé par des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes) et des liaisons covalentes (**Hongsprabhas, et al. 1999; Jeyarajah & Allen 1994**).

Une autre stratégie (celle qui sera utilisée dans nos systèmes d'étude), la plus utilisée pour la formation de ce type de gels, consiste à modifier les interactions électrostatiques entre agrégats par une acidification progressive de la solution protéique pré-agrégée. Le but est de

diminuer le pH de cette solution protéique jusqu'à l'équilibre proche du pI de ces protéines, généralement de l'ordre de 4-5. L'agent d'acidification le plus employé est le glucono- δ -lactone (GDL), qui s'hydrolyse lentement en acide gluconique et libère des protons en solution.

La vitesse d'acidification et le pH à l'équilibre dépendent de plusieurs facteurs : du rapport concentration en protéines/GDL, de la concentration en sels, en protéines et de la température (**Cavallieri & da Cunha 2008**). Ce procédé très utilisé permet de contrôler la vitesse de gélification du système (**Alting, et al. 2003; Bryant & McClements 1998**). A la fin de ce processus, le réseau de gel est formé par l'enchevêtrement des agrégats et l'eau reste piégée dans ce réseau. La structure microscopique des gels acides varie en fonction de la nature des agrégats et la formation de deux types de gels a été mise en évidence : les gels filamenteux et les gels particuliers (**Bryant & McClements 1998**) (**Figure.I.7.**).

Lorsque le pH est éloigné du pI des protéines et en absence du sel, le haut niveau de répulsions électrostatiques permet la stabilisation des agrégats dans la solution. L'augmentation modérée de la force ionique (par exemple 10 mM pour le CaCl_2) ou l'ajout de GDL diminue ces répulsions et conduit au rapprochement et à l'augmentation du nombre de contacts entre ces agrégats, ce qui conduit à la formation d'une structure ordonnée de type filamenteux (**Totosaus, et al. 2002**) (**Figure.I.7.**). Ces gels sont caractérisés par de bonnes propriétés mécaniques et une capacité de rétention d'eau élevée, ainsi que par un aspect transparent ou translucide. Par contre, les gels particuliers sont élaborés à partir d'agrégats formés à faible niveau de répulsion électrostatique (à une force ionique élevée), et présentent un aspect opaque ainsi que des caractéristiques mécaniques moindre que les gels filamenteux (**Nicolai, et al. 2011**).

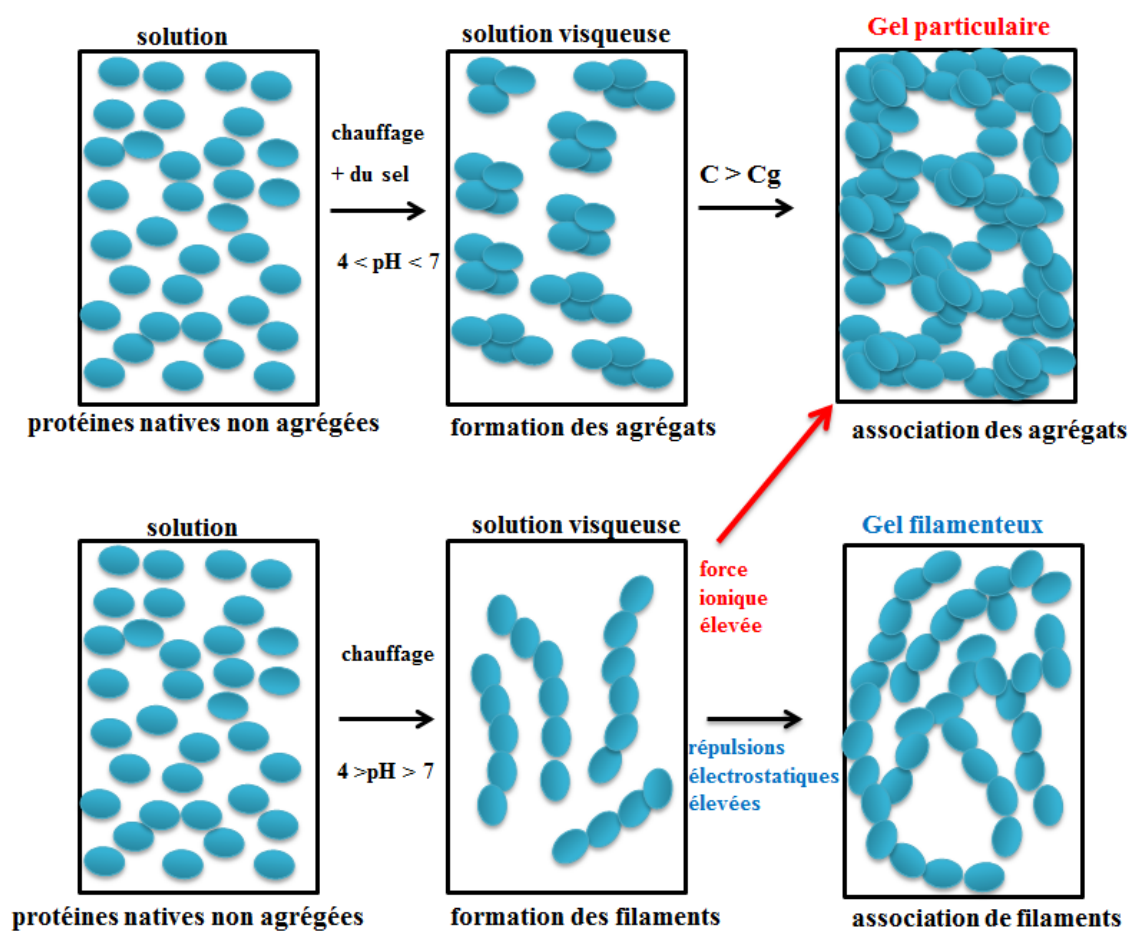


Figure.I.8. Formation de gels filamenteux et de gels particuliers d'après (Bryant & McClements 1998; Nicolai & Durand 2013).

La formation de gels à froid selon les méthodes indiquées ci-dessus nécessite une maîtrise rigoureuse des conditions environnementales afin d'obtenir des gels avec des propriétés désirées. Dans ce but, plusieurs travaux ont été réalisés afin d'optimiser et étendre l'application de ce type de gélification, notamment aux protéines de lactosérum et aux protéines de soja (Alting, et al. 2002; Campbell, et al. 2009; Cavallieri, et al. 2007; Murekatete, et al. 2014). Peu de travaux concernant la gélification à froid des protéines de pois ont été effectués (Mession, et al. 2015a).

Dans ce qui suit, nous allons décrire quelques exemples de gélification acide (par GDL) réalisés sur les protéines de lactosérum et les protéines végétales.

Cavallieri, et al. (2007) ont étudié des gels à froid formés à partir d'agrégats thermiques de protéines de lactosérum (7% m/m) par l'ajout de différentes quantités de GDL. Après 48 h d'incubation à 10 °C, différentes valeurs finales de pH ont été obtenues (5,2 à 3,9).

Les auteurs ont conclu que les interactions électrostatiques étaient responsables dans la formation et le maintien de la structure des gels dans une gamme de pH 4,6-5,2. Les interactions hydrophobes sont quant à elles responsables de cette stabilisation de structure à pH inférieur à 4,6. Les liaisons covalentes formées durant le chauffage sont impliquées fortement dans le maintien et la stabilisation de la structure des gels.

Alting, et al. (2000, 2003) ont étudié le rôle de l'implication des liaisons covalentes dans l'amélioration des propriétés mécaniques des gels formés (**Figure.I.8.**). Des agrégats de protéines de lactosérum (à une concentration de 9% (m/v) et à pH 7,2) ont été formés avec ou sans agent de blocage des fonctions thiol (5 mM NEM). Les systèmes protéiques ont été acidifiés par le GDL.

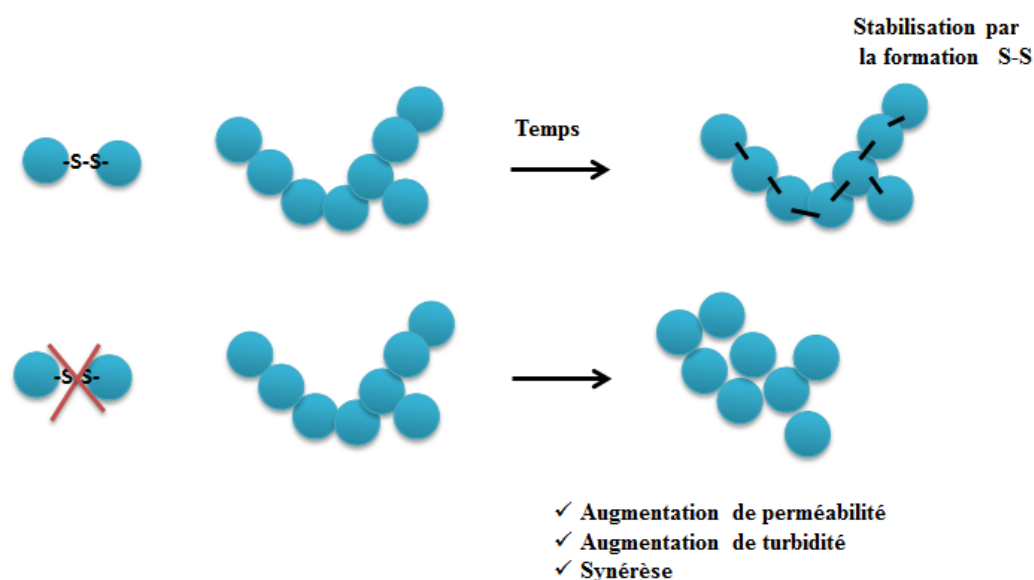


Figure.I.9. Représentation schématique de la stabilisation de la structure de gels acides de lactosérum par la formation de ponts disulfures (**Alting, et al. 2003**).

Par comparaison des résultats des différents agrégats formés, les auteurs ont observé que les échantillons traités en présence de NEM présentent une structure de gel moins ferme due à l'instabilité intrinsèque des agrégats et au réarrangement structural rapide qui se produit en fonction du temps. Cela conduit à la formation d'un réseau plus grossier et à une structure poreuse avec un taux de synérèse plus important. Ces auteurs ont conclu que la formation ou les échanges de ponts disulfures lors de la gélification jouent un rôle important dans le renforcement des propriétés mécaniques de ces gels. Les auteurs confirment que l'association

entre les zones hydrophobes présente un environnement favorable pour les échanges de ponts disulfures qui s'opèrent par effet de proximité.

Plusieurs auteurs ont conclu qu'il est possible de générer des gels acides de protéines de lactosérum (préparés à concentration de 2 à 12% (m /m), à pH de 3-8 et à force ionique de 0-200 mM NaCl) avec différentes caractéristiques structurales et rhéologiques en jouant sur le couple température de thermodénaturation / incubation (de l'ordre de 80- 90 °C / 15-30 min), le pH et la force ionique (**Bryant & McClements 2000; Ju & Kilara 1998; McClements & Keogh 1995**).

Des agrégats de de protéines lactosérum ont été préparés à une concentration de 9% et pH 7, à partir d'une thermodénaturation de 30 min à 90 °C. Les gels ont ensuite été préparés à partir de ces agrégats protéiques par l'ajout de GDL (0,4-2%), CaCl₂ (10-40 mM), NaCl (50-400 mM) et par une hydrolyse des agrégats via une protéase (issue de *Bacillus licheniformis*) à 45 °C. Par comparaison des propriétés texturales (dureté, adhésivité et cohésion) des gels obtenus, les auteurs ont conclu que les gels acides sont plus forts que ceux des gels préparés par ajout de sel et beaucoup plus forts que les gels ayant fait intervenir la protéase (**Ju & Kilara 1998**).

En ce qui concerne les gels acides à base de protéines végétales, peu d'études se sont intéressées aux protéines de pois à l'exception de quelques travaux concernant l'élaboration de gels mixtes de globulines de pois avec des polyosides (**Mession, et al. 2012ab**). Cependant plusieurs études ont été réalisées pour des mélanges acidifiés à base de protéines de soja.

Campbell, et al. (2009) ont étudié la fermeté de gels acides de globulines de soja (à 8% (m/v), et à pH initial 6,9) en fonction de la thermodénaturation des échantillons (chauffés à 95 °C /10 min ou non), du pH final des gels (3,5, 4, 4,5, 5) préparés par l'ajout d'une quantité variable de GDL. Ces auteurs ont mis en évidence l'importance de la dénaturation des protéines avant la gélification. La fonctionnalisation des protéines par la dénaturation thermique induisait une meilleure fermeté du gel par rapport à celui élaboré à partir de protéines non chauffées. Ces auteurs ont également montré que la meilleure fermeté de ces gels a été obtenue pour des pH finaux compris entre 4,3 et 4,7 du fait d'une neutralisation des charges. De même, ces auteurs ont mis en évidence l'amélioration de la texture du gel (fermeté et capacité de rétention d'eau) en fonction de l'augmentation des interactions covalentes dans ce système.

D'autres auteurs (**Perrechil, et al. 2013**) ont montré la possibilité de moduler la fermeté de gels acides de protéines de soja sans chauffage préalable par ajout d'ingrédient comme les polysaccharides. Des mélanges de protéines de soja ont été préparés (chauffés ou non à 98°C/15min) en présence ou non de gomme de caroube (Gc). Une acidification lente par GDL a été induite. Le résultat indique que le gel élaboré à base de protéines natives était plus faible que celui formé à partir de la protéine dénaturée préalablement. Par contre, l'ajout de Gc conduit à l'amélioration des propriétés des gels (augmentation des propriétés mécaniques, capacité de rétention de l'eau et fermeté des gels) indépendamment de l'état des protéines (dénaturées ou natives).

Nishinari al., (2014) ont comparé la cinétique de gélification et la structure de gels à froid de tofu (protéines de soja) préparés par ajout de chlorure de magnésium $MgCl_2$ ou acidifié par GDL. Ces auteurs ont indiqué que le gel de tofu élaboré par le GDL est caractérisé par une structure plus dense que celui gélifié par $MgCl_2$. La vitesse de gélification est beaucoup plus rapide lorsque le chlorure de magnésium est utilisé par rapport à celle obtenue lors de l'ajout de GDL. La gélification par ajout de GDL permet de contrôler la cinétique et conduit à la formation d'un réseau de gel plus ferme (7 fois plus) que celui des gels préparés par $MgCl_2$.

Mession, et al. (2015) ont étudié le comportement d'agrégation et de gélification acide de globulines de pois (PP) et fractionnée en 11S (Leg) et 7S (Vic) à une concentration de 4%, 4%, 3,5% respectivement. Les différentes protéines ont été chauffées à température de 85 °C pendant 60 min avec une rampe de chauffage de 1°C/min à un pH 7,2 et en absence de sel. Après la préparation des agrégats, une gélification acide par le GDL a été effectuée à 20 °C (**Figure.I.8.**).

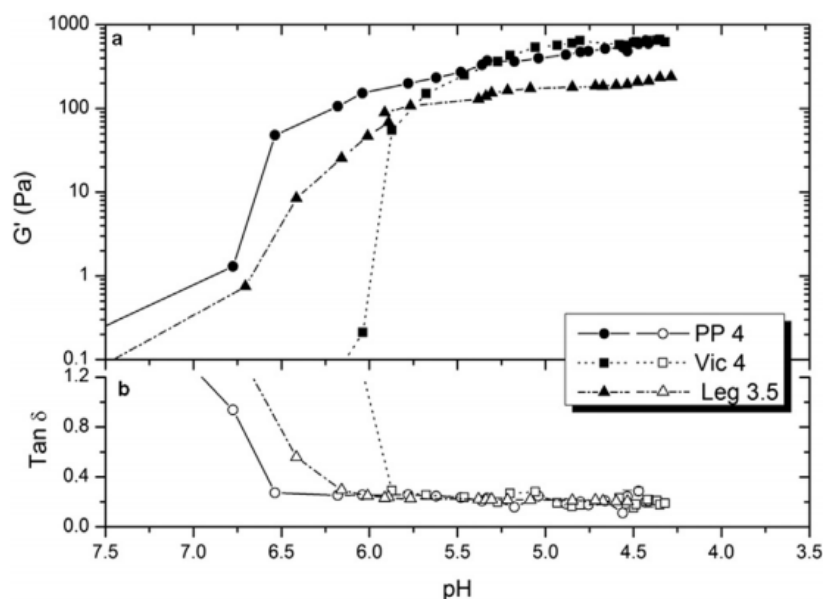


Figure.I.10. Variation (a) du module de conservation (G') et (b) $\tan \delta$ à 20 °C en fonction de la diminution de pH en présence de GDL, pour les agrégats de (PP), fractions Vic et Leg préparés à une concentration de 4, 4, 3,5% respectivement, selon **Messian, et al. (2015)**.

Ces auteurs ont confirmé que les oligomères de 11S se réarrangent en même temps via des interactions hydrophobes et des échanges de liaisons covalente (S^-/SS) lors de la thermodénaturation. Ce réarrangement conduit à la formation d'agrégats de haut poids moléculaire possédant une structure aléatoire. Concernant la gélification des globulines de pois (PP) et des fractions 11S et 7S, les auteurs ont montré que les gels formés d'agrégats de globulines 7S présentent des valeurs de G' final plus élevées que celles des gels formés à partir de globulines 11S. Les auteurs montrent que la gélification des agrégats de globulines totales PP améliore le G' surtout par rapport au cas de la fraction 11S. La transition sol/gel des systèmes formés de globulines 11S se produit à un pH supérieur (6,5) à celui des systèmes à base de globulines 7S (pH 6) ; les auteurs ont attribué cette différence au nombre important des charges répulsives entre les fractions de 7S, qui nécessitent un pH plus faible pour neutraliser ces charges.

I.2.4.3. Agrégation et gélification de protéines en mélange induites par thermodénaturation

L'ajout d'un autre type de protéine aux systèmes à base de protéines végétales peut influencer l'agrégation thermique dans ce système mixte. Pour de tels mélanges, l'agrégation et la caractérisation des mécanismes se complexifient du fait de la variabilité de leurs

structures ainsi que de leurs propriétés physicochimiques (**Howell 1994**). Les interactions protéine-protéine suivent également diverses voies, y compris la séparation de phase par incompatibilité thermodynamique, la précipitation des protéines dues à des interactions électrostatiques, et/ou des interactions synergiques, comme il a été rapporté dans le cas de nombreux gels mixtes à base de protéines animales (**Aguilera & Kessler 1989**). Selon la composition et les ratios des protéines en mélange, la température/durée d'incubation, le pH, la nature du gélifiant, différentes morphologies de gel peuvent être obtenues, particulières ou filamenteux (**Firoozmand & Rousseau 2015**). Ces interactions protéine-protéine peuvent modifier les fonctionnalités des protéines alimentaires comme l'émulsification, le moussage et la gélification qui peuvent se produire pendant le traitement de ces protéines (**Rafe, et al. 2016**).

Plusieurs études se sont intéressées aux interactions lors de la dénaturation thermique et la gélification (thermique et à froid) entre les protéines de soja et des protéines animales comme le concentrat de protéines de lactosérum, le lait écrémé et la caséine micellaire (**Beliciu & Moraru 2013; Roesch, et al. 2004; Roesch & Corredig 2005**).

L'analyse de la littérature montre clairement que les systèmes mixtes à base de protéines de pois et de protéines animales ne sont pas documentés, hormis une étude récente qui définit les interactions entre les protéines de pois et la caséine micellaire lors de leur thermodénaturation (**Mession, et al. 2015b**). Néanmoins, quelques exemples décrits ci-après de systèmes binaires protéines animale et végétale illustrent l'effet de la fonctionnalisation thermique sur le comportement et les propriétés fonctionnelles des biopolymères.

Beliciu & Moraru (2011, 2013) ont montré l'effet de la concentration protéique (2-15% m/m, pour un ratio 50/50) et de la dénaturation thermique (40-95 °C/5-15 min) sur l'agrégation et la gélification thermique pour un mélange de caséine micellaire (MCN) et d'un isolat protéique de soja (PS). Ces auteurs ont mis en évidence l'amélioration des propriétés mécaniques des gels en fonction de l'augmentation de la concentration protéique par rapport à ceux formés à base d'agrégats individuels de MCN et PS. Lors de la thermodénaturation des protéines en mélange, la stabilité thermique des globulines 11S de soja (glycinine) a été augmentée par la présence des micelles de caséine **Figure.I.11**.

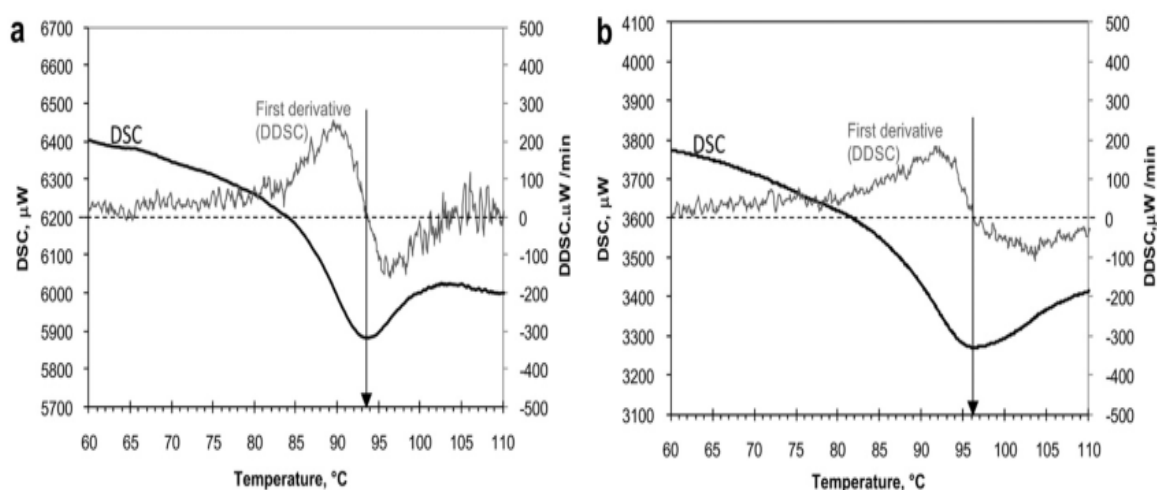


Figure.I.11. Thermogrammes de DSC pour **(a)** la protéine de soja (PS), **(b)** le mélange MCN/PS à une concentration de 12,5% (m/m) **(Beliciu & Moraru 2011)**.

Les auteurs précités ont attribué le changement de la température de dénaturation de la glycine en système mixte à l'effet de l'encombrement stérique imposé par la caséine dans le mélange protéique. Celle-ci limiterait la mobilité moléculaire et la flexibilité de la glycine, affectant par la suite le déplissement de cette protéine. Les mesures de la charge de surface des mélanges montrent que la protéine de soja est stabilisée en présence de caséine micellaire, ce qui empêche la sédimentation de ces protéines. L'agrégation de ces protéines est gérée par des liaisons non covalentes. Les propriétés rhéologiques des gels thermiques mixtes PS/MCN sont proches de ceux purement composés de protéines de soja. A une concentration de mélange comprise entre 7,5% et 12,5%, les gels mixtes formés présentent une séparation de phase locale entre les caséines micellaires et les 11S de soja partiellement dénaturées. Les auteurs suggèrent que la dénaturation thermique des protéines de soja est contrôlée par la caséine micellaire. Les auteurs suggèrent aussi de développer des boissons stables à base de ce mélange.

Mession et, al. (2015) ont aussi montré un changement du comportement d'agrégation des globulines de pois (PP) (fractionnées en légumine (Leg) et viciline (Vic)), sous l'effet d'une dénaturation thermique en mélange avec la caséine micellaire (MCN). Différents mélanges ont été préparés : MCN/Leg et MCN/Vic à une concentration de 4% (m/m) et à un ratio 50/50, thermisé à 85 °C pendant 60 min, à pH 7,1 et en absence de sel. La composition des mélanges a été déterminée dans les surnageants et les culots de centrifugation avant et après dénaturation thermique. La température de dénaturation de la légumine en mélange a augmenté d'environ 4 °C par rapport à celle obtenue pour la légumine seule. Cette

augmentation de stabilité thermique est due à l'effet d'encombrement stérique imposé par la caséine. La composition des culots de centrifugation de ces mélanges à l'état natif a montré la présence de fractions de Leg et Vic. Cela peut être attribué à l'écrantage des charges sous l'effet des cations de calcium apportés par la caséine micellaire donnant lieu à des agrégats sédimentables. Après chauffage, la solubilité de ces fractions a été nettement améliorée dans les mélanges (MCN/Leg et MCN/Vic). Lors du traitement thermique des protéines de pois, les vicilines se dénaturent et s'agrègent par des interactions non covalentes, alors que les légumineuses dénaturées, dans le cas des globulines non fractionnées et dans le cas de la fraction enrichie en légumine, peuvent s'associer par échanges de ponts disulfures, donnant lieu à des agrégats de hautes masses moléculaires. Le chauffage des légumineuses en présence de la suspension de caséine micellaire conduit à la formation (i) d'agrégats solubles de légumineuses liés via des liaisons covalentes et (ii) des agrégats sédimentables de légumineuses dissociées en sous-unités acide et basique liées par des interactions hydrophobe. Par contre, le comportement d'aggrégation et la solubilité des fractions de vicilines ne sont pas affectés par la présence de caséine micellaire.

Roesch & Correding, (2006) ont étudié le comportement d'aggrégation et la formation de gels thermiques de protéines de soja et de lactosérum (WPI) à une concentration initiale de 6% (m/m) de chaque protéine, à pH 7 et à une force ionique de 100 mM NaCl. Des mélanges (protéines de soja/ WPI) ont été préparés à différents ratios massiques et chauffés à 90 °C/60 min avec une rampe de chauffage de 1°C/min. L'évaluation du poids moléculaire par SEC-HPLC des agrégats formés montre la présence d'agrégats de hauts poids moléculaire qui augmente en fonction de la part des protéines de soja dans les mélanges, ce qui indique l'implication d'interactions intermoléculaires entre les protéines lors du chauffage. Ces auteurs ont démontré le greffage covalent (par SDS-PAGE) entre les sous-unités 11S de soja et la β -lactoglobuline (β lg) lors de la thermodénaturation des mélanges. Ils ont également étudié l'effet du changement de ratio (soja /WPI) sur le développement des modules d'élasticité des gels mixtes. Dans les conditions de traitement thermique indiquées ci-dessus, une concentration de 6% de protéine de soja ne permet pas de former un gel, alors que le gel de WPI se forme à cette concentration. Un ajout minimum de 30% de protéines de lactosérum dans les mélanges conduit à la formation de gels mixtes. Les gels mixtes aux ratios massiques 30/70, 50/50 (protéines de soja /WPI) présentent un module d'élasticité (G') inférieur ou égal à celui obtenu pour les gels de lactosérum (100% WPI) (**Figure.I.12.**). Le système au ratio 70/30 présente un G' plus élevé que celui du gel de lactosérum. Les auteurs ont attribué cet

effet à l'amplification des interactions de type hydrogène entre les protéines lors du refroidissement du système.

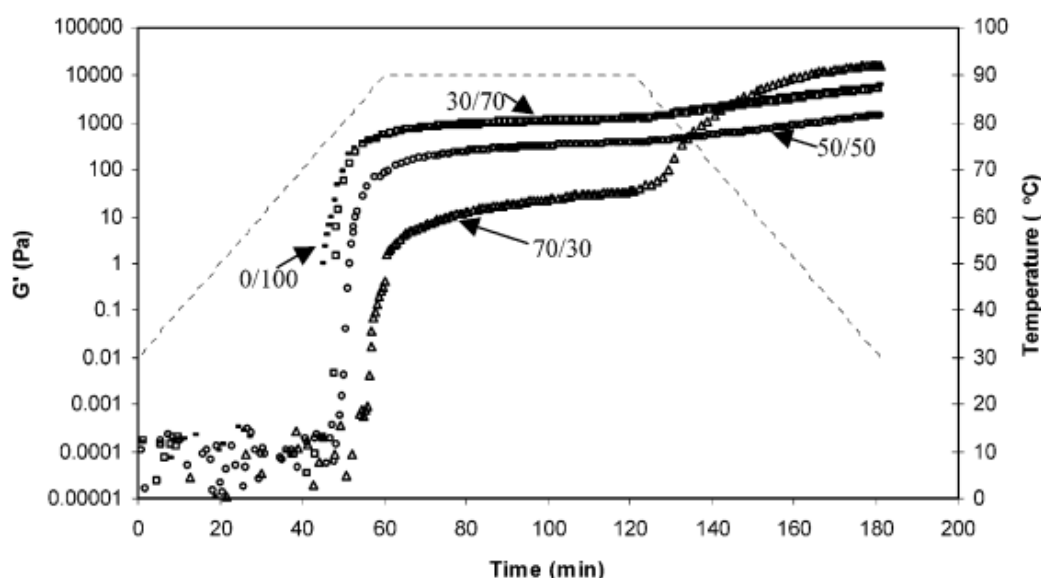


Figure.I.12. Evolution des modules d'élasticité (G') en fonction du temps pendant un cycle de chauffage (90 °C/60min) de mélanges protéines de soja/ WPI (à 6% de protéines totales) à pH 7 et 0,1M NaCl, selon **Roesch & Corredig (2006)**.

Les gels contenant des proportions élevées de WPI possèdent une structure plus fine que les gels composés à 100% de protéines de soja, ce qui indique que les protéines de l'isolat de lactosérum contribuent aussi à l'amélioration de la structure du gel à base de protéines de soja, et à la fonctionnalisation thermique de ce couple protéique qui ne présente aucun signe apparent de séparation de phase (**Roesch & Corredig 2005**).

Des résultats proches ont été obtenus pour un autre couple protéique associant un isolat de protéines de pois (PPI) et des protéines de lactosérum (WPI) (**Wong, et al. 2013**). L'amélioration de la texture des gels thermique à base de protéines de pois a été obtenue par l'incorporation de l'isolat de lactosérum à différents ratios dans les mélanges (PPI/WPI). En effet, ces auteurs ont étudié l'effet de la composition du mélange (PPI/WPI) sur les propriétés mécaniques (rhéologie aux faibles déformations) et texturales (analyse du profil de texture) des gels thermiques mixtes en combinaison de plusieurs facteurs extrinsèques tels que la concentration protéique (concentration totale en protéines 10, 16 et 22%), le pH (4, 6, 8) et la force ionique (0,5 et 3%(m/v) NaCl). Les mélanges ont été chauffés de 25 à 92 °C (rampe de chauffage de 2°C/min) et refroidis rapidement à 25°C (en 8 minutes). Quelque soient le pH et

la force ionique, la thermodénaturation diminue la $C_{g_{th}}$ des mélanges par rapport à ceux obtenus avec le PPI pur. L'implication d'interactions intermoléculaires entre les deux types de protéine conduit à l'augmentation de l'élasticité et la force des gels mixtes par rapport à ceux de PPI purs. Les auteurs ont montré l'effet du pH sur les propriétés des gels formés. Les gels élaborés à pH 6 présentent des propriétés rhéologiques et de texture meilleures par rapport à ceux formés aux pH 4 et 8. Cette différence a été attribuée à l'effet des répulsions électrostatiques entre les sous-unités de convicine (7S). A pH 6, la convicine est très proche de son pI et les charge des groupes N-terminaux sont nulles (**O'kane, et al. 2004**), ce qui diminue les répulsions entre les protéines chargées dans le mélange. A pH 8, les groupes N-terminaux de ces unités sont chargées très négativement (**O'kane, et al. 2004**), ce qui conduit à l'augmentation des répulsions entre les fractions protéiques PPI et WPI et à la diminution les interactions entre ces protéines. Cependant ces travaux n'ont pas abordé les mécanismes de l'agrégation thermique et la nature des interactions moléculaires impliquées dans ces systèmes mixtes.

Rafe, et al. (2016) ont étudié l'effet de l'incorporation de concentré de protéines de lactosérum (WPC) en mélange avec les protéines de son de riz (PR) et la formation des gels mixtes à base de ces protéines. Plusieurs mélanges ont été préparés à différents ratios massiques protéiques PR/WPC (1:1, 1:2, 1:5 et 1:10) à une concentration initiale de 10% (m/m), et chauffés à 90° C pendant 20 min avec des rampes de chauffages variables de (0,5, 1, 5 et 10 °C/min), à pH 7 et en absence de sel. Tous les mélanges présentent des modules d'élasticité plus élevés que les gels thermiques de protéines de son de riz indiquant une amélioration de la cohésion du réseau macromoléculaire. Les auteurs ont montré l'effet de l'augmentation de la proportion de WPC et d'un chauffage lent sur l'amélioration de l'élasticité des gels mixtes. Cette amélioration reflète le niveau de structuration et de cohésion des gels mixtes qui se traduit par l'augmentation de la capacité de rétention d'eau et l'obtention d'une structure ordonnée par rapport à celle obtenue pour les protéines de son de riz seules.

Kolar, et al. (1979) ont mis en évidence l'effet de l'incorporation d'un isolat de protéines de soja ou de caséinate de sodium sur l'amélioration des propriétés texturales de yaourts élaborés à partir de poudre de lait écrémé. La force et la viscosité des systèmes mixtes augmentent proportionnellement à l'augmentation de l'apport massique de caséinate de sodium ou d'isolat protéique de soja dans le yaourt **Figure.I.13**.

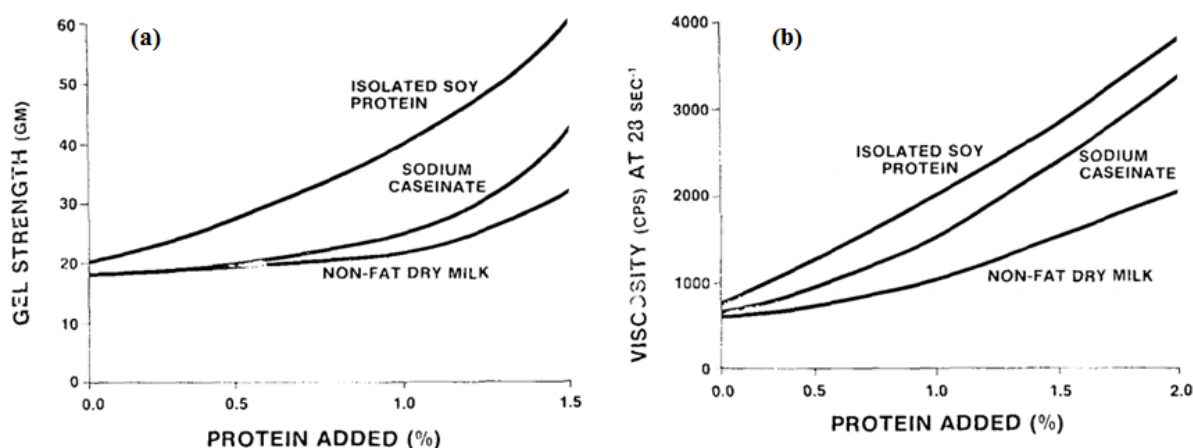


Figure.I.13. Effet de l'incorporation de protéines de soja et de caséinate de sodium à quantité équivalente (ratio de 50/50, soja/lait écrémé et caséinate de sodium/lait écrémé) sur les propriétés texturales :**(a)** force des gels ; **(b)** viscosité du yaourt par rapport à celui préparé à base de 100% de lait écrémé en poudre (**Kolar, et al. 1979**).

Ces auteurs ont montré que l'effet de l'isolat protéique de soja était plus marqué que celui du caséinate de sodium. La formulation de ces mélanges de protéines a conduit également à la réduction du taux de synérèse des gels mixtes. Les auteurs ont proposé la substitution et le remplacement de lait en poudre écrémé par l'isolat de protéines de soja dans la fabrication de yaourt.

Des résultats proches ont été obtenus par **Roesch, et al. (2004)**. Ces auteurs ont prouvés que les propriétés mécaniques (rhéologie aux faibles déformations) et la microstructure (MCBL) des gels acides peuvent être améliorées en augmentant l'apport de protéines de soja dans les mélanges lait écrémé/soja. Des mélanges protéiques de lait écrémé et de globulines de soja (lait /soja) ont été préparés (à une concentration initiale de 12% m/m) à différents ratios, chauffés ou non à 78 °C pendant 30 min à pH 7 et en absence de sel. Les mélanges de protéines natives et agrégées ont été gélifiés par voie acide (par le GDL à des concentrations variables) afin d'atteindre un pH d'équilibre de 4,5. La thermodénaturation des protéines a augmenté la taille des agrégats thermiques par rapport aux mélanges natifs. Les mélanges préalablement thermisés ont présenté des propriétés rhéologiques meilleures que celles des gels mixtes de protéines natives, ce qui confirme le rôle de la dénaturation thermique sur la fonctionnalisation des protéines. En effet, l'implication d'interactions intermoléculaires entre les deux types de protéine lors de dénaturation thermique conduit à

l'amélioration du module d'élasticité (G') par rapport à celui obtenu pour le gel de lait écrémé. **Figure.I.14.**

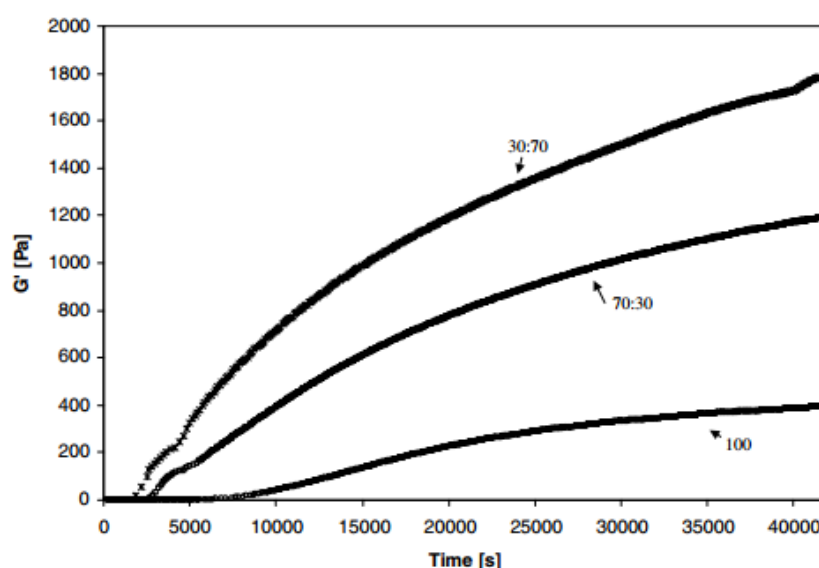


Figure.I.14. Evolution du module d'élasticité (G') en fonction du temps pour les gels acides mixtes à base de lait écrémé et de concentré de protéines de soja à différents ratios massiques (lait/soja) 100/0, 30/70 et 70/30 à concentration totale de 12% m/m. L'acidification a été effectuée à 30 °C par le GDL, selon **Roesch, et al. (2004)**.

Un apport de 30% de protéines de soja dans le mélange augmente le module d'élasticité d'environ 4 fois plus que celui des gels de lait écrémé. L'augmentation de la part de protéines de soja dans les mélanges protéiques lait/soja aux ratios 50/50 et 30/70, induit des valeurs de G' très proches du module d'élasticité du gel à base de soja. Ceci peut être expliqué par la diminution de la teneur en caséines dans ces mélanges. La microstructure des gels mixtes devient plus grossière en présence de protéines de soja, mais aucune séparation de phase n'a été remarquée. Les auteurs suggèrent que les protéines du lait jouent un rôle fondamental dans la formation de la structure du réseau macromoléculaire, et pour un certain ratio, la protéine de soja a contribué à renforcer le gel et compense l'affaiblissement du réseau dû à la plus faible quantité de caséines dans le mélange. Ces auteurs suggèrent également qu'il est possible de concevoir une large gamme de gels mixtes avec des propriétés rhéologiques et microscopiques différentes en modifiant l'apport de soja dans ces mélanges.

I.3. Objectifs et démarche scientifique

Les protéines végétales et plus particulièrement les protéines de pois semblent être une vraie alternative aux protéines de soja au vu des quantités produites par an, mais également du fait de leur composition en acides aminés très proche de celle du soja. Comparativement aux protéines de soja, l'utilisation de protéines de pois comme ingrédient alimentaire est toujours limitée dans l'industrie agroalimentaire ; ce frein est dû probablement au manque de connaissances scientifiques et de savoir-faire.

Dans la littérature, peu de travaux décrivent la formation d'agrégats solubles à partir de ces protéines, ainsi que leur association avec d'autres protéines comme les protéines laitières afin de former des gels thermiques. Parmi ces travaux, aucun n'a abordé les mécanismes de l'agrégation thermique et la nature des interactions moléculaires impliquées dans ces systèmes mixtes.

L'objectif de ce travail est d'apporter une contribution à la valorisation de ces protéines au travers d'études expérimentales visant à obtenir des agrégats mixtes, et d'évaluer les interactions possibles entre les protéines de pois (globulines), choisies comme protéines de légumineuse modèles, et des protéines du lactosérum (β -lactoglobuline). La nature des liaisons physiques et ou chimiques (non covalentes et/ou covalentes) impliquées au cours de ce processus d'agrégation seront explicitées et démontrées au cours de cette étude, en fonction de différents paramètres notamment : (i) la composition initiale de mélange (ratios massiques de β -lactoglobuline (β lg)/globulines de pois (Glob), (ii) le mode de dénaturation thermique (protéines chauffées simultanément en mélange ou séparément), (iii) et la force ionique (5 ou 100 mM NaCl).

L'originalité de notre travail réside dans le fait qu'il s'agit d'un système issu de fractions protéiques de Glob et de β lg qui n'a pas été étudié jusqu'à présent. Une étude complète de la gélification à froid réalisée à partir de ces agrégats solubles par voie acide (acidification par l'ajout de GDL) sera également décrite. Les différents gels obtenus seront caractérisés d'un point de vue physicochimique. Les mécanismes d'interactions entre les différentes espèces présentes en solution et les données de gélification seront confrontés.

Sur la base de l'analyse bibliographique et afin d'atteindre ces objectifs, la suite du document a été organisé en quatre chapitres :

- Matériels et Méthodes (**Chapitre II**)

- Préparation et caractérisation des matières premières (**Chapitre III**)

Dans ce chapitre, l'accent sera porté sur la production des matières premières ainsi que sur leurs caractérisations chimiques et physico-chimiques nécessaires à l'étude. Les procédés d'extraction et de purification des fractions globulaires natives de pois (Glob) et de lactosérum (β lg) y seront notamment décrits. L'amélioration et l'optimisation des protocoles de purification utilisés seront également traitées dans ce chapitre.

- Formation et caractérisation des agrégats thermiques solubles mixtes (**Chapitre IV**)

Dans cette seconde partie expérimentale, nous décrirons la formation et la caractérisation chimique et physicochimique des agrégats mixtes obtenus au cours de notre étude.

Nous discuterons dans un premier temps la formation des agrégats mixtes solubles obtenus à partir d'un système dilué (concentration massique protéique de 1 et 2%) pour des mélanges β lg/ Glob à différents ratios massiques (100/0%, 70/30%, 50/50%, 30/70% et 0/100%), ayant subi une thermodénaturation (40 à 85 °C, 1°C /min, maintien à 85°C/1 heure) à différentes forces ioniques (respectivement de 5 et 100 mM NaCl) et à pH 7,2.

Dans un second temps, les agrégats formés seront caractérisés par différents outils analytiques :

- Méthode de Kjeldhal afin de déterminer la teneur en azote des différentes fractions solubles et insolubles issues de la thermodénaturation ;
- Méthode d'Ellman pour quantifier les interactions covalentes au travers de la formation de ponts disulfures via les groupements sulfhydryls ;
- Mesure d'hydrophobicité via l'utilisation d'un réactif extrinsèque (ANS) pour quantifier l'implication des interactions hydrophobes dans la formation de ces systèmes ;
- SEC-HPLC, DLS pour déterminer le poids moléculaire et la taille des agrégats formés ;
- SDS-PAGE pour déterminer les différentes interactions entre les fractions protéiques dans le mélange, en fonction des conditions expérimentales (force ionique et composition des mélanges). Cette étape permettra de définir les interactions impliquées lors de la formation des agrégats mixtes solubles et de mesurer l'impact de la β lg sur la formation des agrégats à l'échelle méso-structurale.

- Formation et caractérisation des gels acides mixtes (**Chapitre V**)

Le travail consistera d'abord à réaliser une gélification à froid des co-agrégats protéiques (après chauffage simultané des deux protéines ou obtenus séparément) par l'ajout de GDL à une température ambiante de 25 °C. Un suivi de la cinétique d'acidification par un contrôle du pH des gels obtenus sera effectué jusqu'à un pH proche du pI des deux protéines. La détermination de la concentration minimale de gélification à froid et de la capacité de rétention d'eau en fonction de la concentration protéique des mélanges sera également réalisée et décrite. Afin de caractériser les différentes structures des hydrogels formés, une étude rhéologique aux petites déformations ainsi qu'une observation de la microstructure des gels formés par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) seront également menées.

Cette partie de l'étude permettra de comprendre l'influence de la composition des mélanges sur les caractéristiques des systèmes gélifiés par l'évaluation des propriétés de structure dans le cadre d'une étude multi-échelles : macroscopique (rétention d'eau, concentration critique de gélification), mésoscopiques (rhéologie aux faibles déformations) et microscopique (MCBL). D'un point de vue technologique, les résultats permettront d'évaluer, pour la qualité des gels, s'il est plus intéressant de traiter thermiquement les protéines préalablement à leur mélange ou s'il est préférable d'appliquer le chauffage directement sur un mélange des deux protéines. **La Figure.I.15.** résume notre démarche.

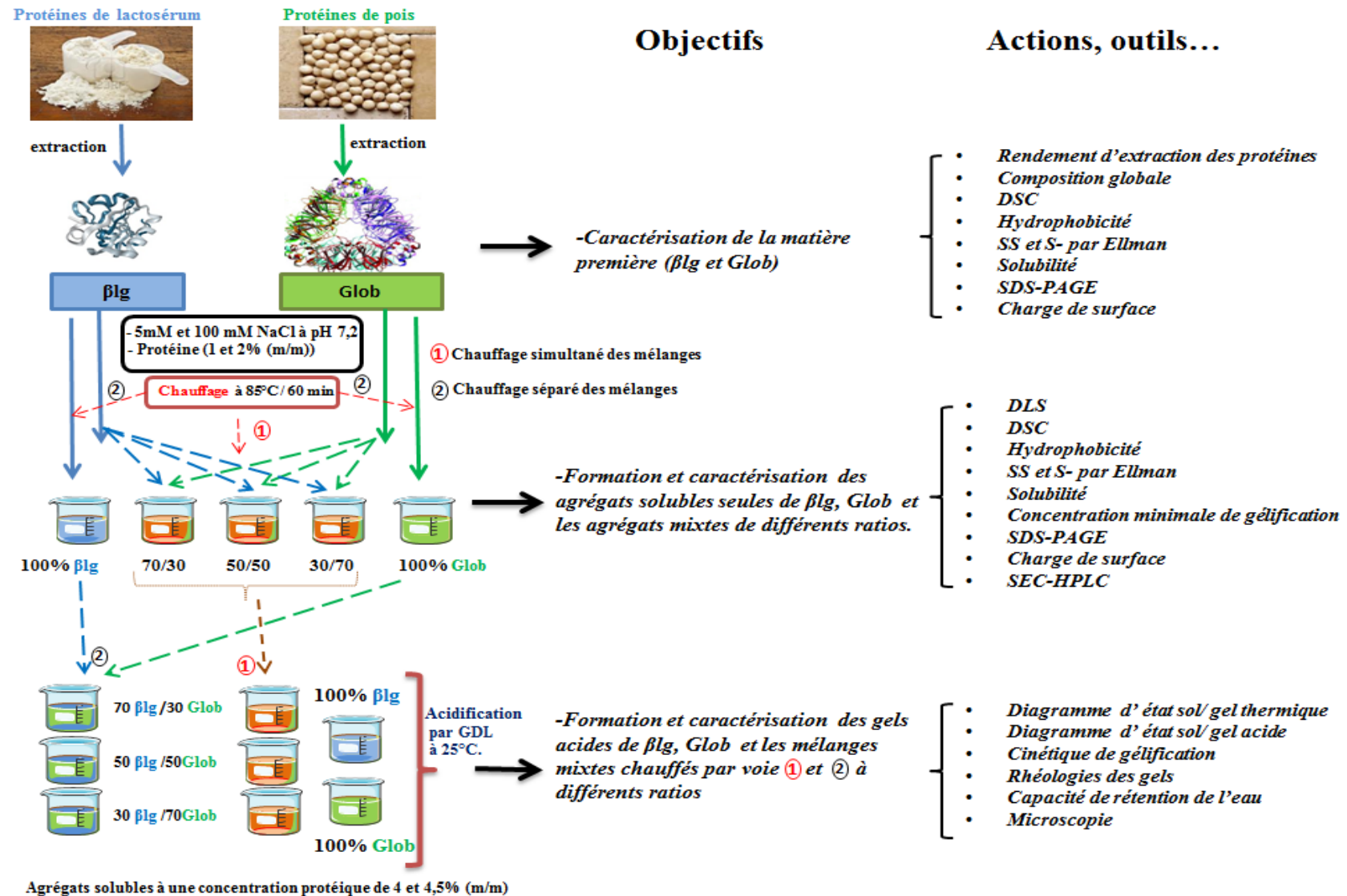


Figure.I.15. Représentation schématique de la démarche scientifique.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. La farine de pois

L'isolat protéique de pois SF85S et la farine de pois utilisés ont été fournis par la société Roquette Frères (Lesterm France). D'après le fournisseur, la matière première à l'origine de ces produits est un mélange de plusieurs variétés de pois cultivées en France.

II.1.2. L'isolat protéique de lactosérum

L'isolat protéique de lactosérum a été fourni par le groupe Ingredia Group SA (Arras, France). Il s'agit de l'isolat de lactosérum Promilk 802 FB.

II.1.3. Réactifs chimiques utilisés

Tous les réactifs et les produits chimiques utilisés pour les analyses sont de grade analytique ; ils ont été achetés chez la société Sigma Aldrich® (France) et VWR (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des fractions protéiques purifiées

II.2.1.1. Extraction des fractions protéiques de globulines de pois (Glob)

L'extraction des globulines a été effectuée à partir de l'isolat protéique de pois (SF85S) et de la farine de pois, selon le protocole établi par **Mession, et al. (2012)**. La composition en protéines, lipides, taux de cendre et humidité des différents échantillons a été déterminée sur l'isolat et la farine de pois, ainsi que sur les fractions de globulines extraites. Les résultats obtenus par calorimétrie (DSC III Setaram) ont montré que l'isolat de pois était totalement dénaturé, ceci étant dû vraisemblablement au processus de transformation industrielle. Ce résultat est cohérent avec les travaux mentionnés dans la littérature (**Shand, et al. 2007**). Sur la base de ce résultat, nous avons décidé de travailler uniquement sur des fractions globulines extraites directement à partir de la farine de pois. Pour ce faire, une délipidation préalable de la farine de pois est nécessaire. Cette étape est primordiale afin de minimiser toutes contaminations de la fraction protéique par les matières grasses réduisant ainsi les interactions protéines-lipides-protéines. D'une manière générale, la délipidation participe à l'amélioration de la solubilité des fractions protéiques de pois (**Mession, et al.**

2012) et diminue la turbidité des dispersions protéiques (**Li ,et al. 2007**). La farine de pois est délipidée deux fois par l'éther de pétrole (98%) d'abord et ensuite par de l'éthanol (96%) à 20 °C (10%, m/m, mise en contact 1h). Les solvants sont ensuite éliminés par une filtration frontale et la farine délipidée est séchée sous vide pendant 48 h.

L'extraction des globulines a été réalisée en fonction des solubilités des différentes fractions (albumines et globulines) suivant le protocole de **Creveu, et al. (1996)**. La précipitation isoélectrique des globulines est effectuée à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium (0,1 M, pH 4,9). Cette étape favorise la solubilisation des albumines (surnageant) et provoque la précipitation des globulines (culot), au point isoélectrique (pH proche de 4.8-4.9). Le culot est lavé successivement 2 fois avec 30 volumes d'eau distillée entre les deux opérations, afin d'éviter une éventuelle contamination de la fraction de globulines par les albumines.

La re-suspension du culot a été effectuée sous agitation à 4 °C pendant une nuit, et dans un tampon de phosphate de sodium (0,1 M, pH 8 en présence de 5% de sulfate de potassium). Les matières insolubles sont éliminées par centrifugation (12 000 x g, 20 min, 4 °C) ; le surnageant contenant les protéines globulaires a été concentré par ultrafiltration puis dessalé par diafiltration contre 10 volumes de carbonate d'ammonium à 5 mM, en utilisant une cassette de 1115 cm² type Kwick Lab (UFELA0010010ST, GE Healthcare, Amersham Biosciences Corp., Uppsala, Suède) avec une membrane de seuil de coupure de poids moléculaire de 10 kDa. La pression du dispositif a été réglée à 2,2 bars. Un ajustement à pH 7,2 a été effectué par ajout d'hydroxyde de sodium à 0,5 M. Une centrifugation (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a permis d'éliminer toutes les matières insolubles. Une quantité de 0,02% d'azide de sodium a été ajouté à la solution protéique pour éviter tout développement microbien et le pH de la solution ajusté à 7,2. La poudre de globulines de pois était obtenue après lyophilisation et conservés à -18 °C. Le procédé d'obtention des globulines de pois est présenté **Figure.II.1**.

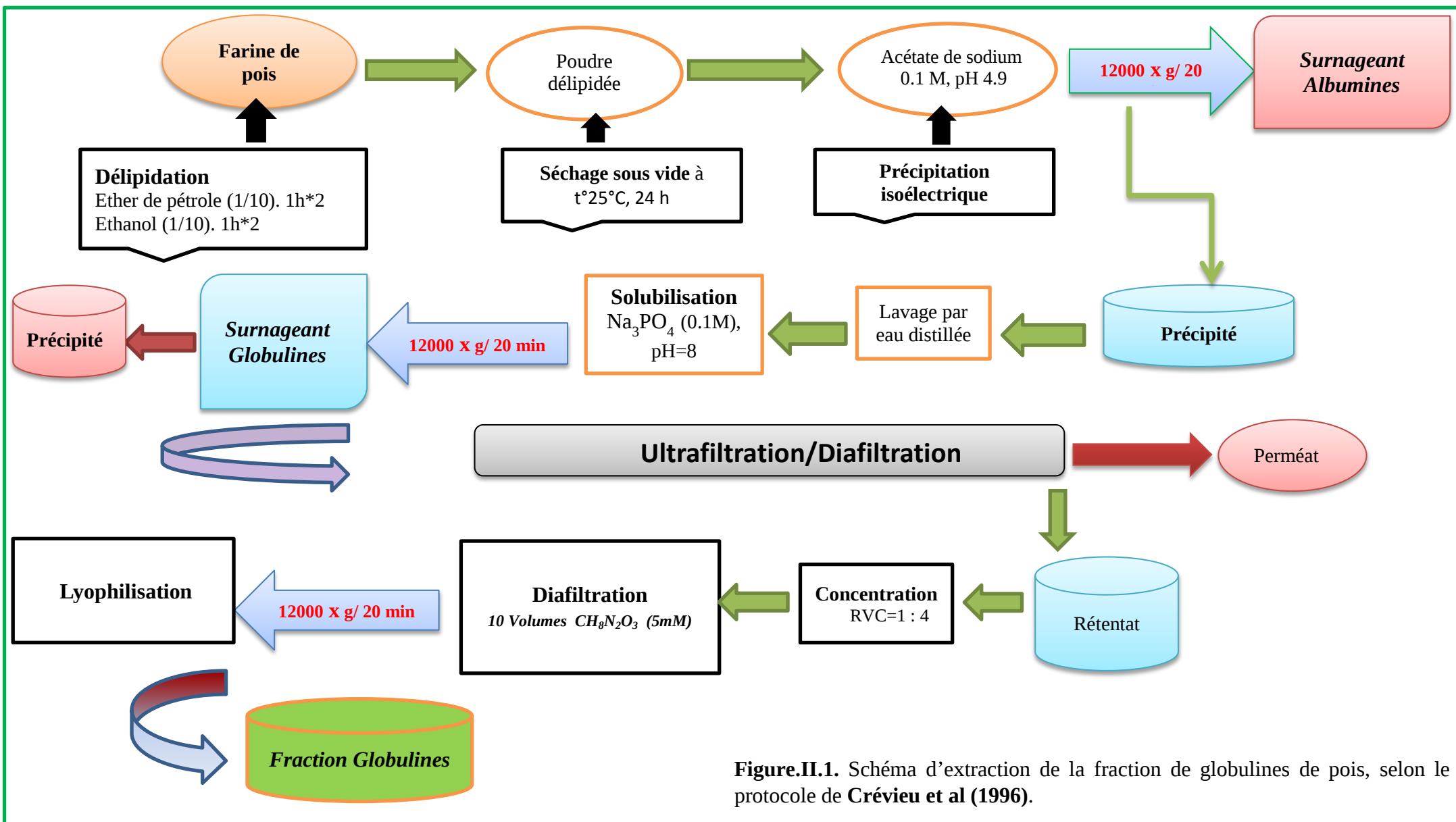


Figure.II.1. Schéma d'extraction de la fraction de globulines de pois, selon le protocole de Créviu et al (1996).

II.2.1.2. Extraction des fractions protéiques de la β -lactoglobuline (β lg)

La fraction de β -lactoglobuline purifiée a été obtenue par le protocole décrit par **Konrad, et al. (2000)** ; **Fox, et al. (1967)**. Cette méthode se compose de 3 étapes. Dans un premier temps, nous avons reconstitué la poudre Promilk 802FB à raison de 10% (m/m). 100 g de l'isolat de lactosérum a été dispersé dans 700 ml d'eau d'ionisé et mise sous agitation à 4 °C pendant une nuit. Après hydratation complète, le volume a été complété à 1000 ml. Dans un second temps, une précipitation sélective des protéines sériques a été effectuée par ajout de 3% de TCA (acide trichloracétique).

Le précipité est ensuite éliminé par centrifugation (12000 x g, 20 min, 4 °C). Le surnageant récupéré est ensuite placé dans une membrane de dialyse avec un seuil de coupure de 10 kDa. L'excès de TCA est éliminé du mélange par dialyse, 3 fois contre 10 volumes l'eau distillée et 3 fois contre 10 volumes d'une solution NaCl à 5 mM à une température de 4 °C. Après la récupération du diafiltrat, une quantité de 0.02% d'azide de sodium a été ajouté à la solution protéique pour éviter tout développement microbien et le pH de la solution ajusté à 7,2. Une centrifugation a été également effectuée pour éliminer toutes les matières insolubles. La fraction protéique purifiée de β -lactoglobuline (β lg) été obtenue après lyophilisation et conservée à -18° C. Le procédé d'obtention de β lg est présenté **Figure.II.2**.

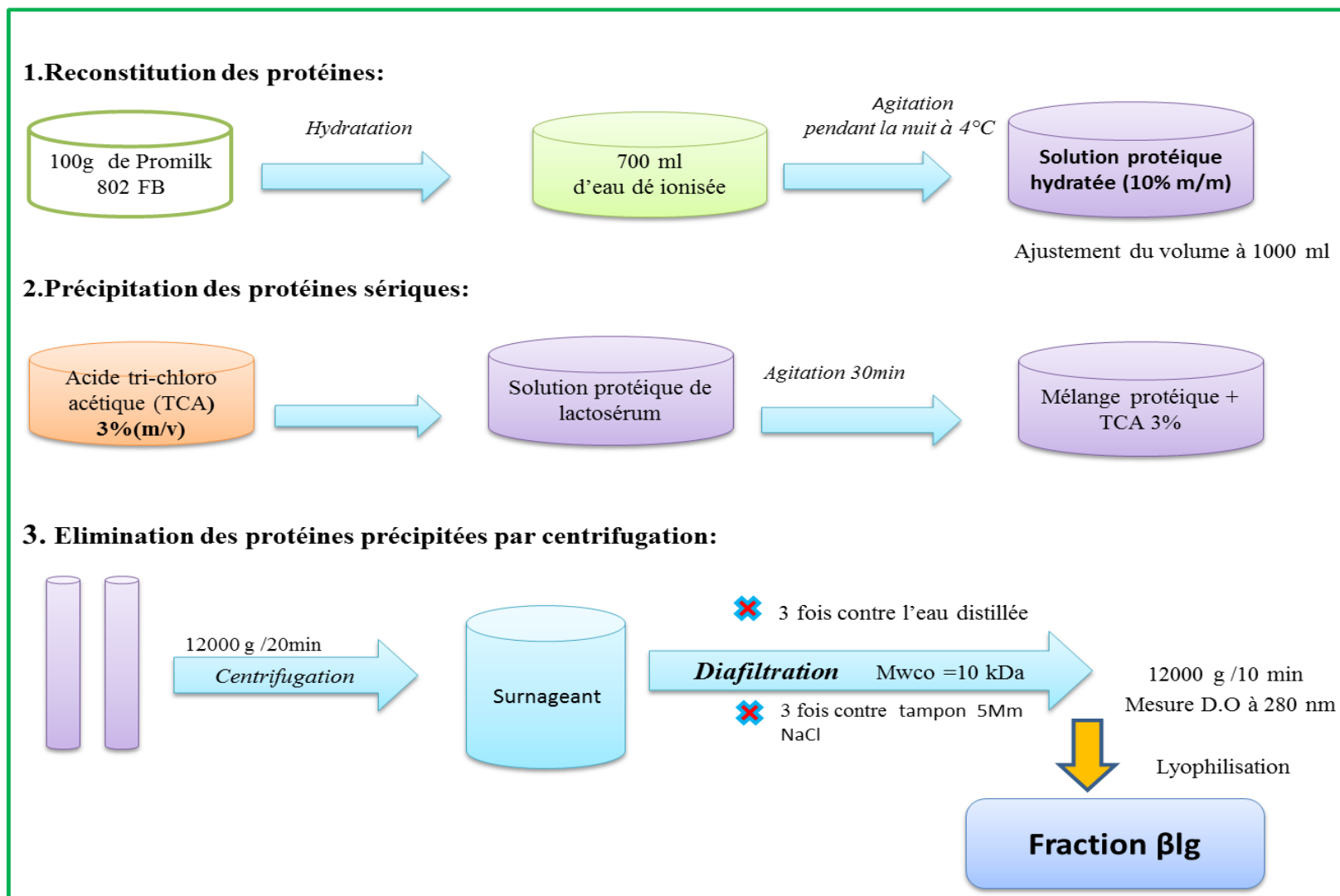


Figure.II.2. Schéma d'extraction des fractions β lg selon le protocole de Konrad,et al. (2000).

II.2.2. Préparation des solutions protéiques

II.2.2.1. Préparation des solutions protéiques natives (Solutions mères)

Les solutions mères protéiques ont été obtenues à différentes concentrations de 1 à 7% (m/m). Les solutions tampons utilisés étaient composés de 10 mM phosphate respectivement et de 5 et 100 mM NaCl ; le pH a été ajusté à 7,2 avec une solution à 0,1 M d'HCl. Les différentes solutions protéiques obtenues, ont été centrifugées (12000 x g, 20 min), afin d'éliminer la matière protéique insoluble. Un dosage de protéines a été effectué pour déterminer la concentration réelle des solutions mères. Les solutions mères ont ensuite été stockées à 4 °C. Il est très important de noter que malgré la délipidation des protéines de pois, les solutions de Glob présentaient une légère turbidité contrairement aux solutions de β lg qui restaient limpides.

II.2.2.2. Préparation des agrégats solubles

Les agrégats solubles ont été obtenus selon le protocole décrit par **Roesch, et al. (2005); Schmitt, et al. (2007)**. Des solutions de concentrations de 1 à 4,5% (m/m) de Glob et β lg, ont été préparées séparément dans un tampon phosphate de 0,01 M et à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl. Le pH a été ajusté à 7,2 avec une solution d'HCl à 0,1 M. Les solutions protéiques ont été agitées pendant 24 heures afin d'assurer une hydratation complète de la matière protéique. Les dispersions protéiques ont ensuite été centrifugées (12000 g pendant 20 min à 20 °C) pour éliminer les matières insolubles, et les surnageants ont été filtrés avec des filtres membranes de 0,45 μ m (type HA, Millipore).

Des mélanges β lg/Glob ont ensuite été préparés respectivement à différents ratios massiques, de 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 et 0/100. Les échantillons ont été transvasés dans des tubes en verre scellés hermétiquement et placés dans un bain marie à température équilibrée à 40 °C. Une consigne de chauffage de 1°C / min de 40 à 85 °C a été appliquée. Le chauffage des échantillons à 85 °C a été maintenu pendant 60 minutes. Après la dénaturation thermique, les échantillons ont été refroidis rapidement dans un bain de glace pendant 10 min et centrifugés (12000 g, 20 min à 20° C). La concentration en matière azotée a ensuite été dosée sur le surnageant.

II.2.3. Caractérisation des fractions protéiques natives et des agrégats solubles

II.2.3.1. Mesure de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche a été déterminé selon la méthode 925.1 (AOAC 1990). Un échantillon de 1 g est pesé dans une capsule en aluminium préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante, puis il est refroidi dans un dessiccateur pendant 2 heures. La masse sèche est moyennée sur trois mesures. Le pourcentage en matière sèche (MS) est déterminé par l'équation (II.1):

$$\% \text{ MS} = (M_{\text{sec}})/M_i * 100 \dots\dots\dots \text{(II.1)}$$

M_i : masse de l'échantillon initial (g) ;

M_{sec} : masse de l'échantillon sec (g) après passage dans l'étuve à 105 °C.

II.2.3.2. Mesure de la teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale est déterminée par la méthode 923.03 (AOAC 1990). Les échantillons déshydratés sont placés dans un four à 600 °C pendant au moins une nuit. La quantité de sels des échantillons est moyennée sur trois mesures. Le pourcentage de matière minérale est calculé par l'équation (II.2):

$$\% \text{ MM} = M_{\text{cendres}}/M_{\text{sec}} * 100 \dots\dots\dots \text{(II.2)}$$

M_{sec} : masse de l'échantillon en (g) après passage à l'étuve à 105 °C ;

M_{cendres} : masse des cendres en (g) issue de l'échantillon après calcination à 600 °C.

II.2.3.3. Mesure de la teneur en protéine par dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été réalisé selon la méthode 920.87 (AOAC 1990), par Kjeldahl dans une unité de minéralisation et de distillation Büchi. La teneur en protéine a été ensuite calculée à partir de la quantité d'azote présente dans l'échantillon, en utilisant le coefficient K de conversion azote-protéine égal à 6,25 pour les protéines de pois et 6,38 pour les protéines de lait (AOAC 1990).

Une minéralisation de l'échantillon à analyser (0,5 g pour les poudres, 2 g pour les solutions) est nécessaire à haute température (400 °C) pendant 1 heure en présence de 20 ml d'acide sulfurique concentré et d'un catalyseur à base de Cu^{2+} (Kjeltab). L'azote de

l'échantillon est transformé complètement sous ces conditions en ions ammonium. Après refroidissement, un volume de 50 ml de soude à 40% a été ajouté à l'échantillon minéralisé pour permettre la formation de l'ammoniac. L'ammoniac produit est entraîné à la vapeur d'eau puis piégé dans une solution d'acide borique (2%). L'ammoniaque est dosée directement par une solution d'acide chlorhydrique de normalité connue. Généralement une solution de titration de 10 mM de HCl a été employée. Le dosage est effectué par mesure du pH ; ainsi le volume équivalent de HCl a été relevé lorsque le pH atteint la valeur de l'acide borique seul. A partir du volume HCl utilisé, la quantité d'azote total de l'échantillon est calculée par l'équation (II.3):

$$\% \text{ Protéine} = (V * N * 14 * 100) / (m * (\% \text{ MS}) / 100) * K \dots\dots\dots (\text{II.3})$$

V: volume d'HCl utilisé pour la titration de l'échantillon (ml) ;

N : normalité de l'acide chlorhydrique ;

m : la masse de l'échantillon ;

% MS : pourcentage en matière sèche de l'échantillon ;

K : facteur de conversion des protéines de pois (6,25) et des protéines de lactosérum (6,38).

II.2.3.4. Teneur en lipides extractibles par l'éther de pétrole

La matière grasse présente dans les différents échantillons a été extraite par la méthode 923.03 (AOAC 1990), par un solvant organique qui est l'éther de pétrole en utilisant un appareil de Soxhlet. Une quantité de 10 g d'échantillons est introduite dans des cartouches en cellulose et 150 ml d'éther de pétrole sont introduits dans le ballon contenant des pierres ponce pour assurer une agitation permanente durant le chauffage. L'éther de pétrole est chauffé à reflux pendant 5-6 heures. Durant le chauffage, les vapeurs de solvant traversent un système de réfrigération, ce qui provoque la condensation des vapeurs dans les siphons, conduisant ainsi au retour du solvant dans le ballon, accompagné des lipides extraits. Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les lipides restent piégés dans le ballon. Les échantillons sont ensuite étuvés à 50°C pendant 24 heures. La teneur en matière grasse des différents échantillons est ensuite calculée selon l'équation (II.4) :

$$\% \text{ MG} = (m1 - m0) / (m * (\% \text{ MS}) / 100) * 100 \dots\dots\dots (\text{II.4})$$

MG: la teneur en lipides par rapport à la matière sèche de l'échantillon (%) ;

m_0 : la masse du ballon vide contenant les quelques pierres ponce (g) ;

m_1 : la masse du ballon contenant les quelques pierres ponce et l'extrait lipidique sec (g) ;

m : la masse de l'échantillon introduit dans la cartouche (g) ;

% MS : matière sèche de l'échantillon de départ (%).

II.2.3.5. Solubilité des protéines en fonction du pH et de la force ionique

Pour étudier l'effet du pH et la force ionique sur la solubilité des protéines en milieu aqueux, nous avons utilisé le protocole expérimental décrit par **Funtenberger, et al.(1995); Messian, et al.(2012)**. Des solutions protéiques (β lg, Glob), d'agrégats solubles à 1 et 2% (m/m) et des mélanges d'agrégats protéiques à différents rapports massiques (β lg/Glob), ont été préparés dans un tampon phosphate à différentes forces ioniques de 5 et 100 mM NaCl et agitées pendant 2 heures à température ambiante. Le pH de ces solutions a ensuite été ajusté par d'une solution de NaOH (0,1 M) ou d'HCl (0,1 M) afin d'élargir la gamme de pH étudiée allant de 2 à 10. Les mélanges ont été mis sous agitation pendant une heure. Les suspensions protéiques ont été centrifugées à 10 000 x g pendant 10 min à 4 °C. La teneur en protéine des surnageants a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. La solubilité est exprimée en gramme de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales, l'azote soluble (NS) est calculé selon l'équation (II.5).

$$NS(\%) = \frac{N(\%) \text{ dissous dans le surnagent}}{N(\%) \text{ initialement introduit}} \times 100 \dots \dots \dots (II.5)$$

II.2.3.6. Concentration minimale de gélification thermique

La concentration minimale de gélification thermique (C_{gth}) des deux fractions protéiques purifiées (β lg, Glob) a été déterminée selon le protocole expérimental cité par **(Renard & Lefebvre 1992; Sun & Arntfield 2010)**, et est basée sur une observation visuelle. Des solutions protéiques (Glob, β lg) ont été préparées séparément dans un tampon phosphate (10 mM, pH=7,2) aux forces ioniques de 5 et 100 mM NaCl, et à des concentrations allant de 1 à 10% (m/m). Un volume de 4 ml de dispersions protéiques a été mis dans des tubes en verre étanches et chauffé selon le protocole de dénaturation thermique décrit précédemment (de 40 °C à 85 °C avec une rampe de chauffage de 1°C/min, 85 °C pendant 60 min). Les tubes ont été refroidis dans un bain de glace pendant 10 min et laissés à 4 °C pendant toute la nuit. Le lendemain, les tubes ont été retournés et observés. Nous avons

considéré la $C_{g_{th}}$ thermique comme étant la concentration minimale à laquelle le gel tient sans effondrement.

II.2.4. Electrophorèse SDS-PAGE

II.2.4.1. Principe de la méthode

L'électrophorèse est une technique analytique qui permet de séparer les protéines sur gel, sous l'influence d'un champ électrique, conduisant à une migration des protéines en fonction de la différence de mobilité des polypeptides et de leurs poids moléculaires. Cette technique permet d'identifier et de quantifier la composition protéique d'un échantillon. Elle permet également d'estimer les effets d'une dénaturation et d'en élucider les interactions entre protéines agrégées.

Le gel d'électrophorèse est préparé par réticulation des monomères d'acrylamide, qui forment un réseau tridimensionnel. Ce maillage dépend de la concentration en acrylamide. Les protéines migrent avec une vitesse constante dans le gel de faible maillage, alors que dans un gel de fort maillage (gel de séparation), la vitesse de migration changera d'une espèce protéique à l'autre ; les petites particules atteindront le front de migration (faible poids moléculaire) rapidement, et les grosses particules seront piégées loin de ce front de migration (hauts poids moléculaire).

L'incorporation d'un tensioactif anionique comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) au cours de la préparation de gels permet d'augmenter la charge négative globale de la protéine. D'autre part, l'ajout du SDS dans le tampon échantillons permet de dissocier les sous-unités des protéines oligomériques et un déploiement complet des chaînes de polypeptides. Pour bien visualiser la migration totale des fractions protéique, il est indispensable d'ajouter à la présence de SDS, un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT), qui réduit toutes les liaisons covalentes de type S-S, formés initialement entre les protéines natives ou agrégés.

II.2.4.2. Mode opératoire

Les différents échantillons (farine, isolat, fractions natives de β lg et de Glob ; agrégats protéiques solubles de β lg et de Glob, ainsi que les agrégats solubles des mélanges préparés à différents ratios massiques) ont été traités et préparés à une concentration de 5-10 mg/ml dans un tampon d'échantillon (65 mM tris-HCl à pH 8, 20% de glycérol, 0,002% de bleu de

bromophénol; tous les pourcentages sont exprimés en m/v) ; avec 2% SDS (condition non réductrice NR) ; avec 2% de DDT et 2% SDS (condition réductrice CR) ; avec seulement le tampon d'échantillon ; dans ce dernier cas, nous avons considéré que l'échantillon est traité dans des conditions natives (N). Il faut bien noter que les échantillons préparés dans CR doivent être chauffés à 90 °C pendant 10 min pour réduire les liaisons covalentes disulfures.

Ensuite, tous les échantillons ont été centrifugés (10000 x g pendant 10 min) et 20 µl de chaque échantillon ont été déposés dans les puits du gel. Une gamme de protéines standard (Sigma, S8445, large gamme, poids moléculaire 6,500-200,000 Da) a été utilisée en tant que marqueurs moléculaires. La séparation des protéines a été effectuée à 40 V pendant 2 h, puis 120 V jusqu'à la fin de migration des protéines. Une intensité constante de 20 mA a été appliquée sur le gel. Le tampon de migration contenait 25 mM de Tris, 0,192 M de glycine, 0,1% de SDS (p/v). Les gels ont été colorés avec 0,2% (m/v) de bleu de Coomassie R-250 en solution dans l'éthanol:eau (4: 1 v/v), et l'excès de colorant a été éliminé avec un mélange de méthanol, acide acétique et d'eau distillé respectivement a des volumes 4: 1: 5.

Les photographies du gel ont été prises et numérisées avec un Molecular Imager ChemiDoc XRS + Système (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) équipé d'un logiciel pour l'analyse densitométrique ImageLab TM (3.0). La teneur relative de chaque polypeptide a été corrélée par l'intensité de bande (I).

Les teneurs relatives (i) des fractions piégées dans la surface de gel de concentration ($M_w > 200$ kDa), et (ii) des fractions ayant migrées à partir des puits 'N' ou 'NR' ont été estimées, en calculant le rapport de l'intensité totale des fractions sous condition native, sur le total de l'intensité de fractions sous condition non réductrice ou condition réductrice ($1-I_N/I_{NR}$ ou $1-I_{NR}/I_R$ respectivement) du même échantillon analysé dans le même gel d'électrophorèse. Dans les conditions 'R', il a été considéré que l'ensemble des polypeptides pouvait migrer ; donc l'intensité totale (somme des intensités de toutes les bandes) a été attribuée à la quantité totale de protéine déposée.

II.2.5. Analyse enthalpique différentielle

II.2.5.1.Principe de la méthode

L'analyse enthalpique différentielle (Dynamic Scanning Calorimetry, DSC) est une technique d'analyse, qui permet de mesurer notamment l'absorption et/ou la libération de la

chaleur lors la thermodénaturation d'une molécule. D'une manière générale, les protéines perdent leur conformation spatiale de façon irréversible après un chauffage intensif. Cette analyse permet de déterminer la température de dénaturation thermique d'une molécule ainsi que la quantité d'énergie nécessaire pour le changement d'état de cette dernière.

Au cours de la mesure, l'échantillon est chauffé simultanément avec une référence inerte (solution dans laquelle la protéine est solubilisée), et le flux de chaleur différentiel entre l'échantillon et la référence est mesuré au cours du temps. Un pic positif ou négatif par rapport à la ligne de base, apparaît lorsqu'une réaction respectivement exothermique ou endothermique aura lieu. Si un échantillon ne subit pas de changement d'état, le flux échangé avec la référence se limitera à la ligne de base. Le sommet du pic indique la température moyenne de dénaturation (T_d). L'analyse enthalpique différentielle permet ainsi de connaître les températures des changements d'état mais aussi leurs enthalpies associées représentées par les aires sous leurs pics respectifs (ΔH_d).

II.2.5.2.Mode opératoire

L'étude des propriétés thermiques des fractions natives de β lg, de Glob, et les différents mélanges protéiques de β lg/Glob à différents ratios massiques a été réalisée par Micro DSC III (SETARAM, France), à partir de 500 μ g de solutions protéiques préparées dans un tampon phosphate 0,01 mM et de 5 à 100 mM NaCl, à une concentration protéique de 2 et 10% (m/m). Les échantillons sont chauffés de 25 à 100 °C avec une rampe de chauffage de 1°C/min suivi d'un refroidissement de 100 à 25 °C. La référence inerte est une solution composée de tampon phosphate 0.01 mM à 5 ou 100 mM NaCl. Les températures de début d'initiation du déploiement de la structure protéique (T_{onset}), et de dénaturation (T_d) des échantillons, ont été calculées via le logiciel TA Universal Analysis Software, à partir de la surface du pic endothermique ; la valeur d'enthalpie de dénaturation des protéines ΔH_d a été convertie en J/g_{protéine} en fonction de la concentration protéique utilisée. Chaque mesure est répétée sur 3 échantillons différents.

II.2.6. La charge de surface ou le potentiel Zeta (ζ)

II.2.6.1. Principe de la méthode

Pour évaluer les interactions électrostatiques protéines-protéines et protéines-solvant, nous avons mesuré le potentiel Zeta (ζ) des solutions mises en jeu. Cette mesure est basée sur la charge apparente des particules contenues dans une phase aqueuse. Ces entités sont chargées soit négativement ou positivement. La valeur de cette charge de surface permet de comprendre les interactions entre ces particules en suspension ainsi que leur stabilité. Ce comportement est fortement dépendant de la charge électrique existante à l'interface des différentes particules et/ou solvant. La charge effective d'une particule en suspension dans une phase aqueuse diffère de sa charge réelle du fait de la présence de contre-ions en solution. Les contre-ions les plus proches de la particule y sont fortement retenus par des attractions électrostatiques. Ils constituent la couche de Stern, qui se déplace avec la particule, abaisse sa charge réelle et forme autour de cette particule un film protecteur. La concentration en contre-ions diminue quand on s'éloigne de la particule pour atteindre la concentration d'équilibre en solution. Le potentiel Zeta (ζ) correspond au niveau de la couche de Stern. Une valeur élevée, en valeur absolue, du potentiel empêche l'agrégation des protéines. A l'inverse, une valeur proche de zéro permet aux particules de se rapprocher les unes des autres et de s'agréger.

La mesure du potentiel Zeta (ζ) se fait par analyse de la solution dans une cellule de mesures en quartz reliée par deux électrodes de cuivre. Le système est placé sous l'objectif d'un microscope optique et d'une caméra CAD. Un courant alternatif est appliqué simultanément avec l'émission d'un laser de 633 nm de longueur d'onde. Les spots de diffusion de chaque particules sont alors suivis et visualisés par la caméra lors du déplacement des particules, et la trajectoire de ces particules ainsi que la distance parcourues sont ensuite calculées par le logiciel d'analyse d'image de l'appareil. L'intensité de signal et la fréquence de diffusion de laser de particules dépendent proportionnellement de leurs vitesses de déplacement, qui est également dépendante de la charge de surface de ces particules. La mobilité électrophorétique des particules est considérée comme étant sa vitesse par unité de champ électrique. Elle est calculée à partir de la vitesse des particules en appliquant la théorie de Von Smoluchowski modifiée par (**Hunter 1986**) selon l'équation (II.6)

$$\mu E = V/E \dots \dots \dots \text{(II.6)}$$

V : la vitesse des particules ($\mu\text{m.s}^{-1}$) ;

E : le champ électrique appliqué par unité de longueur (V.cm^{-1}) ;

μE : la mobilité électrophorétique ($\mu\text{m. cm. s}^{-1}.\text{V}^{-1}$).

Pour calculer le Zeta potentiel (ζ) des particules, les valeurs de mobilité ont été multipliées par un facteur dépendant de la permittivité selon la nature de solvant, en appliquant l'équation de Henry (II.7).

$$\zeta = 3\eta f(ka) / 2\epsilon\mu E \dots\dots\dots \text{(II.7)}$$

ϵ : la permittivité de milieu ;

η : la viscosité du milieu de dispersion ;

f (ka) : une fonction liée à la proportion entre la taille (a) caractéristique du système et la longueur de Debye ($1/\kappa$).

II.2.6.2.Mode opératoire

Les mesures de potentiel Zeta (ζ) ont été faites avec un Zêtamètre (Zeta Compact, CAD instrument) équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 5 mW) de longueur d'onde 633 nm ; l'appareil a d'abord été étalonné avec une solution standard DTS005 de latex (potentiel Zeta de -50 mV).

Les mesures ont été faites sur 1 mL d'échantillons natifs et agrégés de βlg , de Glob ainsi que de mélanges de $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ à différents ratios massiques à des concentrations protéiques de 1 et 2% (m/m), à des dilutions de 0,01%. Les mesures ont été effectuées à une température de 25 °C. Pour toutes les mesures, le pH a été fixé à 7,2 et à force ionique de 5 ou 100 mM NaCl. Les échantillons ont été placés dans une cellule de mesure en quartz. Un courant alternatif de 100 V et un faisceau de laser avec une émission de 633 nm ont été appliqués. En fonction de l'équation (II.7), l'appareil recalcule le potentiel Zeta (ζ). Les mesures sont répétées 3 fois.

II.2.7. Détermination de la quantité de thiols libres (S⁻) et de ponts disulfures (SS)

II.2.7.1. Principe de la méthode

Le dosage des thiols libres et totaux est basé sur la réaction d'Ellman (**Ellman 1959**). Cette technique repose sur deux étapes. Dans un premier temps, l'échantillon contenant les groupements thiols est mis en présence d'une solution de chlorure de guanidinium (GDNHCl), et dans un second temps en présence d'un excès de DTT (dithiothreitol). En ajoutant du DTNB (L'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque), le S⁻ va réagir avec le DTNB pour NTB²⁻ et le signal est détecté par spectrométrie en mesurant l'absorbance de la lumière visible à 412 nm.

II.2.7.2. Mode opératoire

Le dosage des S⁻ totaux, S⁻ libres des solutions de protéines natives et agrégées de βlg et Glob aux concentrations 1 et 2% (m/m) et de forces ioniques différentes (5 et 100 mM en NaCl), ainsi que des mélanges d'agrégats a été effectué via la procédure décrite précédemment. L'ensemble des solutions ont été dialysées contre un tampon à 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,5 (pendant 24 h, 5 changements, 4 °C, ratio solution: tampon 1:20) avant analyse.

Les mélanges réactionnels ont été préparés en conditions (chimiquement) dénaturantes en ajoutant aux solutions protéiques (650 µL) à 1 et 2% (m/m) une solution de chlorure de guanidinium GDNHCl (3 M, 750 µL) ainsi que 100 µL de DTNB (1 mM) préparés préalablement dans le tampon phosphate susmentionné, puis agités vigoureusement et placés dans l'obscurité pendant 15 min. L'absorbance a été mesurée à 412 nm à 25 °C, en utilisant un coefficient d'extinction de 12900 M⁻¹/cm, qui a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage de NAC (N-acetyl cystéine). Pour chacun des échantillons, les teneurs en S⁻ libres, exprimées en µmol S⁻/g_{protéine}, et les teneurs en S-S, exprimées en µmol S-S/g_{protéine}, sont déterminées comme suit (équation II.8 et II.9) :

$$\mu\text{mol S}^-/\text{g}_{\text{protéine}} = (77,51A)/C \times D \dots\dots\dots \text{(II.8)}$$

A : Absorbance à 412 nm ;

C : Concentration de l'échantillon en protéines (mg/ml) ;

D : Facteur de dilution ;

La valeur 77,51 est le résultat du calcul suivant : $10^6 / 1.29 \times 10^4$;

où : 10^6 est la conversion du mol au $\mu\text{mol/ml}$, $1.29 * 10^4$ est le coefficient d'extinction molaire recalculé à partir de droites d'étalonnage établies par N-acetyl-cystéine (de 0 à 80 μM). La quantité de S-S correspondante est à la moitié de la différence entre thiols totaux S^-_T et thiols libres SH_L (équation II.9).

$$\mu\text{mol SS/g}_{\text{protéine}} = (S^-_T - S^-_L) / 2 \dots\dots\dots \text{(II.9).}$$

II.2.8. Détermination de l'hydrophobicité de surface des solutions protéiques

II.2.8.1.Principe de la méthode

L'hydrophobicité de surface renseigne sur les interactions hydrophobes intermoléculaires; elle est déterminée en utilisant des sondes telles que l'ANS (anilidonaphtalène-8-sulfonate). Cette sonde fluorescente est définie comme capteur du changement conformationnel des protéines par dénaturation et de la formation d'interactions hydrophobes lors de l'agrégation de ces dernières. Le principe de ce dosage est donc basé sur les interactions hydrophobes mises en jeu entre la sonde et les acides aminés hydrophobes accessibles des protéines. Ces interactions induisent la formation d'un complexe fluorescent après une excitation du mélange.

II.2.8.2.Mode opératoire

L'hydrophobicité de surface des solutions protéiques natives (βlg et Glob), des différents échantillons traités thermiquement à différentes concentrations (1 et 2%) et à deux forces ioniques de 5 et 100 mM NaCl a été mesurée par fluorimétrie extrinsèque via l'utilisation d'une sonde fluorescente ANS (1-anilino-8-naphthalene-sulfonate) selon la méthode décrit par **Kato & Nakai. (1980)**. Les solutions protéiques natives ainsi que les mélanges à différents ratios massiques chauffés à 85 °C pendant 60 min, ont été diluées à différentes concentrations allant de 0,004 à 0,02% dans un tampon phosphate 0,01 M (pH= 7,2). Une solution d'ANS (8,0 mM dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2) a été également préparée dans la même solution tampon. 20 μl de l'ANS sont ensuite ajoutés à 4 ml de chaque solution.

L'intensité de fluorescence a été mesurée avec un appareil FluoroMax-4 spectrophotomètre (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA) à des longueurs d'ondes de 370 nm (excitation) et 470 nm (émission). Les valeurs de l'intensité de fluorescence du tampon et des dilutions protéiques (blancs sans l'ajout d'ANS) ont également été mesurées.

Le degré d'hydrophobicité (H_0) a été exprimé comme la pente initiale de l'intensité de fluorescence, en fonction de la concentration en protéine de chaque échantillon et calculé par régression linéaire. Les mesures ont été répétées 3 fois au minimum.

II.2.9. Détermination de la taille des particules par DLS (Diffusion dynamique de la lumière)

II.2.9.1.Principe de la méthode

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude du changement de taille et de distribution des particules présentes dans les différents mélanges protéiques, à l'état natif ainsi que dans les solutions dénaturées thermiquement afin de détecter la présence ou non d'agrégats mixtes préparés dans les conditions citées précédemment. La diffusion dynamique de la lumière est une technique d'analyse qui nous permet d'avoir une information sur la polydispersité des particules dans des suspensions protéique ainsi que sur la taille des populations formées par ces particules.

Le principe de cette technique est basé sur l'interprétation des variations d'intensité de la lumière diffusée par des particules présentes dans une suspension colloïdale soumise à des mouvements browniens et lors de leurs interactions avec d'autres particules. La taille des particules (rayon hydrodynamique ou le diamètre hydrodynamique (D_h)) est déterminée par la loi de Stokes-Einstein basée sur le mouvement brownien des particules en fonction de la viscosité et de la température de la phase aqueuse. Pour calculer la granulométrie des particules, il est nécessaire de mesurer la vitesse de déplacement de ces particules via la mesure de la diffusivité de la lumière (coefficient de translation) de celles-ci dans leur solvant.

Lorsque le solvant est connu et la température constante, les variations de l'intensité de lumière diffusée en fonction du temps sont attribuées à la diffusion des entités en solution. Lors de la mesure, un corrélateur calcule l'ajustement du cumul d'intensité de lumière diffusée suivant une décroissance exponentielle dans le cas des particules sphériques. Ce qui permet de calculer le coefficient de diffusion translationnelle, qui est lié à un seul diamètre apparent (sphérique) de particules. La distribution du diamètre hydrodynamique apparent (D_h) a été obtenue à partir de coefficient de diffusion translationnel moyen de distribution en utilisant l'équation de Stokes-Einstein (II.10):

$$Dh = KT/3\pi\eta Dt \dots\dots\dots (II.10)$$

Où :

Dh : diamètre apparent de particules ;

k : constant de Boltzmann ;

T : température de solution (unité) ;

η : viscosité de solution (unité) ;

Dt : coefficients de diffusion translationnelle.

II.2.9.2.Mode opératoire

Un appareil PSS-380 Nicomp (Santa Barbara, CA, USA) a été utilisé dans cette étude. L'instrument de DLS est composé d'un laser à faisceau (632 nm de longueur d'onde) à un angle de diffusion fixe de 90°, et un photo-détecteur connecté à un corrélateur CW388.

Selon le mode opératoire décrit par **Schmitt, et al. (2007)** ; **Donato, et al. (2009)**, la température de l'analyse a été fixée à 25 °C. Les échantillons de protéines étudiés (natives, agrégats de β lg et Glob et les mélanges β lg / Glob d'agrégats à différents ratios massiques) ont été dilués de manière adéquate à 0,1% (m/m) dans une solution tampon phosphate à 10 mM à 5 ou 100 mM NaCl, et filtrés avec une membrane de cellulose de 0,22 μ m (Millipore Corp.). Les analyses ont été effectuées dans des cellules en verre d'un volume de 1 cm³. La durée de la mesure a été fixée à 20 min, et au moins cinq répétitions ont été effectuées avec des prises d'échantillons différentes à une température de 25 °C.

II.2.10. Détermination de la distribution des tailles des particules par SEC-HPLC

II.2.10.1. Principe de la méthode

La chromatographie d'exclusion stérique de haute performance (SEC-HPLC) est une variante de la chromatographie en phase liquide. Elle est aussi appelée chromatographie sur gel du fait que cette technique nous permet de fractionner des particules selon leur poids moléculaire ou plus exactement selon leur volume hydrodynamique en solution.

Le principe de cette méthode est de véhiculer les molécules ou macromolécules par un tampon d'élution (phase mobile) à un débit fixé, dans une colonne remplie par un matériau contenant des polymères ayant une structure poreuse (phase stationnaire). Les macromolécules ayant un haut poids moléculaire vont être éluées rapidement contrairement à

celles dont la masse moléculaire est plus faible qui auront un temps de séjour plus long, et emprunteront un chemin plus tortueux à travers la phase stationnaire. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à cette méthode du fait que l'analyse par électrophorèse SDS-PAGE ne nous a pas permis d'obtenir une estimation sur le poids moléculaire des différents agrégats protéiques obtenus. Cette technique constituait donc une méthode de choix pour déterminer la distribution du poids moléculaires des différentes espèces présentes en solution.

II.2.10.2. Mode opératoire

La distribution de tailles des espèces présentes dans les différents échantillons étudiés a été effectuée en utilisant un système de chromatographie liquide à haute pression (HPLC Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon), équipé d'une pompe isocratique (Shimadzu LC-20AT) et d'un détecteur UV-visible (Shimadzu SPD-20AV) adapté avec une colonne d'exclusion de taille TSK gel G6000 PWXL (7,8 mm de diamètre intérieur x 30 cm de longueur, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Allemagne). La colonne a été équilibrée à 25 °C avec la phase mobile, consistant en 50 mM de tampon phosphate (Na_2HPO_4) et 0,05 et 100 mM de NaCl respectivement pour les échantillons préparés à une faible et forte force ionique, pH 7,2, préalablement dégazés et filtrés à travers des filtres de 0.22 μm . La colonne a été pré-calibrée avec des standards protéiques fournis par SIGMA ALDRICH et GE Healthcare. Les marqueurs utilisés étaient : Bleudextran (M_w : 2000 kDa), Thyroglobuline (M_w : 669 kDa), Apoferritine (M_w : 443 kDa), β -Amylase (M_w : 200 kDa), Conalbumine (M_w : 75 kDa), Ovalbumine (M_w : 43 kDa), Ancar (M_w : 29 kDa), Ribonucléase A (M_w : 13,7 kDa).

Les solutions protéiques ont été filtrées au travers d'une membrane (Millipore Corp.) de 0,45 μm suivant le mode opératoire cité par **Roesch, et al. (2005)**. Les échantillons ont été injectés manuellement dans le système en utilisant une boucle d'échantillonnage de volume d'injection de 100 μL . La vitesse et le temps d'élution total ont été fixés respectivement à 0,4 ml/min et à 60 min. Les analyses ont été enregistrées à une longueur d'onde de 280 nm et les pics d'élution ont été analysés avec le logiciel de la LC solution (V. 1,25, Labsolutions, Shimadzu). Tous les échantillons ont été mesurés en triplicat.

Le seuil de séparation de la colonne utilisé était compris entre 10 et 8×10^3 kDa (sur la base la fiche technique établie par le fournisseur) ; le volume totale de la colonne était de 14.34 ml et le calcul du volume mort de la colonne donnait $V_0 \sim 4.3$ ml. Les agrégats élués obtenus ont été collectés, dialysés contre de l'eau distillée, lyophilisés, et analysés par

électrophorèse SDS-PAGE, afin de déterminer la composition et la distribution de poids moléculaires des différents agrégats mixtes obtenus lors de la dénaturation thermique des mélanges protéiques de β lg et Glob.

II.2.11. Formation et caractérisation des gels à froid

II.2.11.1. Diagramme d'état sol-gel

Un diagramme d'état sol-gel_{ther} (gel thermique) a été établi afin de déterminer les concentrations minimales de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) des protéines seules de β lg et Glob ainsi que des mélanges. Un autre diagramme d'état sol-gel_a (gel acides) a été réalisé à partir des agrégats formés précédemment (premier diagramme) à des concentrations inférieures à la $C_{g_{th}}$, afin de déterminer les concentrations minimales de gélification acide C_{g_a} .

L'approche choisie consistait à élaborer deux diagrammes d'état sol-gel acide via la préparation de gels mixtes à froid : soit à partir de suspensions d'agrégats résultant du chauffage direct des mélanges des 2 protéines natives, soit à partir de mélanges d'agrégats préparés à partir des 2 protéines chauffées séparément dans les mêmes conditions expérimentales (85 °C pendant 1 heure). Du tampon phosphate à 10 mM et pH 7,2 a été utilisé pour la préparation des différentes solutions protéiques. Celles-ci ont été réalisées sans ajustement de la force ionique pour l'élaboration des diagrammes d'état. Pour cette étude, nous avons considéré que seuls les ions présents initialement dans les poudres purifiées ont contribué à la force ionique. Les diagrammes de phase de gélification à froid ont donc été établis pour des solutions de 3 ml qui contenaient ; (i) des agrégats solubles de Glob seuls, des agrégats solubles de β lg seuls, des mélanges d'agrégats de β lg et de Glob obtenus séparément; (ii) des agrégats formés après chauffage de mélanges β lg/Glob aux mêmes ratios massiques que précédemment (70/30, 50/50, 30/70).

Une étude macroscopique a été effectuée ; cette étape repose sur la formulation d'un grand nombre de mélanges de concentration protéique initiale de 1 à 6% pour β lg et de 1 à 9% pour Glob. Le GDL (Glucono-Delta-Lactone) a été ajouté sous forme d'une poudre dans les solutions d'agrégats protéiques de β lg, de Glob ainsi que de leurs mélanges à différents ratios massiques. La quantité totale de GDL ajoutée dépend de la concentration de protéine selon la formule suivante (Munialo, et al. 2014):

$$\% \text{ GDL (m/m)} = 0,0065 * (\% \text{ Protéine}) + 0,045 \dots\dots\dots(\text{II.11})$$

Le GDL a été ajouté à des concentrations variant de 0,4% à 0,97% (m/m) pour atteindre un pH autour de 4 – 4,5 après 24 h à température ambiante (20 °C). L'évolution du système lors de l'acidification a été réalisée par un suivi et mesure de pH des gels pendant 24 heures. La procédure utilisée pour construire les diagrammes d'état repose sur une observation visuelle pour déterminer la concentration minimale de gélification acide. Celle-ci considère que la gélification des mélanges est obtenue lorsqu'une dispersion contenant des agrégats solubles gélifie après l'ajout de GDL. On obtient dans ces conditions des systèmes réticulés qui ne coulent pas après retournement des tubes à essais.

II.2.11.2. Capacité de rétention d'eau des gels (Cre)

La capacité de rétention d'eau des gels formés a été déterminée par centrifugation selon le protocole utilisé par **Maltais, et al. (2005)**. 2 ml de solutions d'agrégats protéiques à pH initial de 7,2, ont été introduits dans des tubes scellés hermétiquement, puis incubés pendant 24 h à température ambiante en présence de GDL. Les gels formés ont été centrifugés (5000 g, 5 min, 20 °C) et l'eau libérée a été mesurée. La Cre a été calculée par l'équation (II.7) :

$$Cre = 100 * [1 - (Qt_{eau_{libérée}} / Qt_{eau_{gel}})] \dots\dots\dots (II.12)$$

Où: $eau_{libérée}$ est la masse en g de l'eau libérée après centrifugation ; eau_{gel} est la masse en g de l'eau contenue dans le gel avant centrifugation.

II.2.11.3. Etude rhéologique des gels

II.2.11.3.1. Principe de la méthode

La rhéologie oscillatoire à petite déformation ou rhéologie dynamique est une technique qui permet d'évaluer la structure lors de la formation et de la réticulation d'un polymère. Cette technique est capable d'estimer le point de transition sol-gel, c'est-à-dire le passage de l'état liquide vers l'état semi solide. Le principe de cette méthode consiste à faire subir à l'échantillon une contrainte non destructive, c'est à dire sans modification des propriétés mécaniques. Cette contrainte est une fonction sinusoïdale dans le temps. Les résultats sont obtenus sous forme d'une sollicitation sinusoïdale (γ) (équation II.13) à des

fréquences variables dont on déduit la mesure du module de conservation G' et du module de perte G'' .

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \dots\dots\dots (\text{II.13})$$

Avec γ_0 et ω l'amplitude et la fréquence de l'oscillation, respectivement.

Dans le domaine de faibles amplitudes où le comportement viscoélastique est linéaire, le matériel répondra sous forme de contrainte complexe σ (σ est l'amplitude de la contrainte) (équation II.14.)

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \dots\dots\dots (\text{II.14})$$

Ainsi des matériaux viscoélastiques comme des gels ont une réponse intermédiaire entre ces deux cas extrêmes (équations II.15). De ce fait, un temps de relaxation $\tau = \eta/G$ (η est la viscosité de l'échantillon) permet de déterminer des déformations lentes (comportement de solide) à rapides (comportement de liquide)

$$\sigma(\omega, t) = \gamma_0 (G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)) \dots\dots (\text{II.15})$$

Un module dit de stockage (ou conservatif) G' et un module visqueux G'' (ou de perte) sont alors définis, correspondant à l'énergie élastique accumulée au cours de la déformation et à l'énergie dissipée ou perdue, respectivement. Autrement dit, un module complexe de cisaillement G^* peut être décomposé en deux termes, dont l'un (G') représente la contrainte en phase avec la déformation (la partie réelle) et l'autre (G'') correspondant à la contrainte en déphasage avec la déformation (la partie imaginaire) (équation II.16):

$$G^* = \sigma^*/\gamma^* = G' + i G'' \dots\dots\dots (\text{II.16})$$

Sachant que δ représente le déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement, d'une manière générale, on conçoit que δ reflète la contribution relative de la composante visqueuse et élastique (équation II.17).

$$\tan(\delta) = G''/G' \dots\dots\dots (\text{II.17})$$

Dans le domaine linéaire de viscoélasticité, les valeurs de G' et G'' sont indépendantes de l'amplitude de déformation quelle que soit la valeur de fréquence ω . Par contre, pour des valeurs de déformation très élevées, des modifications dans la structure telles que la rupture de liaisons conduisent à la diminution des deux modules (domaine non linéaire).

Au point de gel, les deux modules sont égaux ($G' = G''$; $\tan \delta = 1$). Un réseau macroscopique commence alors à se former, et le module élastique G' augmente fortement du fait de sa structuration. Les deux modules évoluent alors suivant une loi de puissance, indépendamment de la fréquence appliquée et dans un domaine large de fréquences. Le suivi de l'évolution de la gélification des biopolymères en solution, est réalisé par les mesures de G' et G'' dans le temps à fréquences basses et constantes, où l'on peut distinguer plusieurs phases suivant l'état des systèmes étudiés :

- (i) Dans un système liquide ou visqueux on trouve $G'' > G'$; cela traduit une faible contribution du comportement élastique ;
- (ii) Au croisement de G' et G'' ($G' = G''$), que l'on appelle aussi le point de gel (transition sol-gel), où $\tan \delta = 1$ et donc indépendant de la fréquence appliquée. A partir de ce point le G' commence à augmenter plus fortement que G'' ;
- (iii) A la fin du processus de gélification, les valeurs de G' et G'' atteignent leurs seuils maximum et se stabilisent. A ce moment $G' \gg G''$ et la valeur de $\tan \delta$ sera très faible dans le cas de gels forts (gel élastique). La contribution visqueuse est négligeable et le module élastique restera stable quelle que soit la fréquence appliquée. En ce qui concerne les gels viscoélastiques présentant des imperfections, G' et G'' augmenteront quel que soit la fréquence appliquée. Dans un domaine de basse fréquence, G' se rapproche d'un plateau d'équilibre (module d'équilibre du réseau gélifié).

II.2.11.3.2. Mode opératoire

Les propriétés rhéologiques des gels ont été déterminées à l'aide du rhéomètre SR-5000 (Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, Etats-Unis), équipé d'une géométrie de type plan-plan ($d = 25$ mm). Les mesures ont été réalisées sur des échantillons à différentes concentrations protéiques 4 et 4,5% (m/m) à partir d'agrégats solubles purs de β lg et Glob, d'agrégats solubles issus de mélanges (β lg /Glob) préparés à différents ratios massiques (respectivement à 70/30, 50/50, 30/70). Les mêmes mesures ont été réalisées sur des mélanges β lg /Glob des 2 protéines chauffées séparément (de concentration en protéine de 4 et 4,5%). Après l'ajout de GDL, les échantillons (2 ml) ont été rapidement vortexés, centrifugés (1000 x g, 1 min pour éliminer les bulles d'air), et 1 ml de solution a été déposé sur le plateau du rhéomètre.

Les mesures ont été réalisées sous contrainte imposée (0,5-2 Pa, déterminée préalablement par des pré-tests pour rester dans le domaine de linéarité) à une fréquence de 1 rad/s et un entrefer (gap) de 1 mm. La température de la mesure a été maintenue à 25 °C par le biais d'un système de régulation de température à effet Peltier. Les contours des échantillons ont été recouverts d'une huile minérale pour éviter l'évaporation de l'eau et le séchage de l'échantillon au cours de la mesure. L'évolution des modules de stockage G' et de perte G'' et le profil de $\tan \delta = G''/G'$ a été enregistrée en fonction du temps (cinétique de gélification pendant 10 h), de la fréquence (spectre mécanique) ainsi que de la contrainte (le domaine linéaire a été vérifié avant et après les mesures rhéologiques) à l'aide du logiciel RSI Orchestrator version (V.6.5.8).

II.2.11.4. Etude de la structure des gels à froid par MCBL (Microscopie Confocale à Balayage Laser)

II.2.11.4.1. Principe de méthode

Nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser pour caractériser les différentes structures de gels acides formés au cours de notre étude. Cette technique se compose d'éléments optiques et d'un dispositif de balayage laser reliés à un logiciel de traitement numérique d'images permettant de visualiser et d'observer les échantillons microscopiques en trois dimensions.

Le principe de cette technique repose sur le passage d'une lumière d'excitation émise par un laser qui traverse un diaphragme ou « pinhole d'entrée ». Ce dernier réduit la source à un point lumineux. Le laser est choisi en fonction de la longueur d'onde d'excitation sélectionnée. Un autre passage du faisceau lumineux sur un miroir dichroïque permet de concentrer la lumière d'excitation en direction de l'objet étudié, et plus précisément sur le plan d'échantillon, appelée plan focal. Ce dernier capte la lumière émise par la sonde excitée puis la retransmet par l'objectif, en passant par un filtre d'émission, vers le photomultiplicateur. Ce dernier transforme le signal lumineux en signal électrique. La lumière émise par la sonde située au-dessus et au-dessous du plan focal est filtrée à l'entrée du détecteur par la présence d'un « pinhole de sortie ». L'image est reconstituée point par point par balayage de différent plan (x, y) du champ analysé lors de la mesure.

II.2.11.4.2. Mode opératoire

L'appareil utilisé dans l'étude de la microstructure des gels acides formés est un microscope confocale à balayage laser (MCBL) de marque Nikon modèle Eclipse TE-2000, en mode fluorescence. La source de lumière est un laser néon-argon. Les différents échantillons étudiés ont été marqués d'une manière non-covalente par une sonde fluorescente, la rhodamine B isothiocyanate. Des agrégats protéiques seuls (de β lg et Glob) à différents concentrations massiques, des mélanges d'agrégats (β lg/Glob) à différents ratios massiques chauffés simultanément ou séparément, ont été marqués de manière non-covalente avant l'addition de GDL. 20 μ L d'une solution aqueuse de rhodamine B isothiocyanate (RITC, à 1 mg/ml) ont été ajoutés à 2 ml de solution d'agrégats protéiques, suivi d'une agitation à l'obscurité à 4 °C pendant au moins 1 h. La RITC se fixe aux amines libres des protéines via des interactions hydrophobes. Après l'ajout de GDL en fonction de la concentration protéique des agrégats, les mélanges ont été vortexés pendant une minute, centrifugés (1000 x g, 1 min pour éliminer les bulles d'air). Un volume de 20 μ l d'échantillon est déposé sur une lame de microscope, ensuite recouvert immédiatement par une lamelle. La lame et lamelle sont soudés par du vernis à ongle.

Les échantillons ont été laissés dans l'obscurité pendant une nuit, pour que la gélification se produise à une température de 25 °C. L'observation microscopique de la microstructure des différents gels est effectuée le jour suivant. Le grossissement des images de 20 et 100 fois a été appliqué ; les longueurs d'onde d'émission et d'excitation étaient 543 nm et comprises entre 560 et 590 nm, respectivement. L'acquisition des images a été faite au format JPEG avec une résolution de 512 x 512 pixels. Des corrections ont été opérées afin d'éliminer un maximum de bruit, de rectifier l'intensité du fond de l'image et d'en améliorer son contraste ; les images obtenue ont été analysées par un logiciel Image J (v. 1.45).

II.3. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés au minimum trois fois. L'analyse de variance (ANOVA) des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).le test de comparaison de moyenne utilisé est le LSD (Least Significant Difference) au seuil de signification de 95%. Le teste de t-student au seuil de 5% a été aussi utilisé mais dans le cas où le nombre de groupes à comparer est réduit à deux.

Chapitre III : Préparation et caractérisation des matières premières

L'objectif de ce travail sera en premier lieu d'obtenir en quantités suffisantes des fractions de globulines de pois (Glob) et de β -lactoglobuline (β lg) les plus « natives » possibles. Le travail consistera d'abord à optimiser les paramètres d'extraction et de purification de ces matières premières ainsi que d'évaluer leurs caractéristiques physicochimiques (suspensions protéiques à différentes forces ioniques de 5 et 100 mM NaCl).

III. Préparation et caractérisation des matières premières

III.1. Préparation et caractérisation de la Globuline de pois

III.1.1. Méthode d'extraction

L'objectif de ce travail est d'élaborer des agrégats solubles par voie thermique à différentes forces ioniques (5 et 100mM NaCl), et d'obtenir des hydrogels à froid partir de ces agrégats. Afin de bien maîtriser le processus d'agrégation et de gélification, il fallait s'assurer dès le début de la qualité des protéines utilisées et de la quantité des fractions de Glob produites pour couvrir nos besoins durant toute la durée de la thèse. Nous avons extrait la fraction de globulines à partir de l'isolat protéique de pois S85F fourni par la société Roquette SA (Lestrem, France). Après la caractérisation physicochimique de cet isolat et des globulines extraites, il s'est avéré que cette matière première était dénaturée et donc inutilisable pour nos expérimentations. Cela confirme d'autres travaux cités antérieurement sur la qualité des isolats de protéines de pois disponibles sur le marché (**Shand, et al. 2007**).

Afin d'obtenir des fractions protéiques de Glob « natives », l'extraction a été faite à partir d'une farine de pois fournie par le groupe Roquette SA (Lestrem, France). Nous avons utilisé le protocole d'extraction décrit par **Crévieu, et al. 1996**.

Ce procédé est basé sur deux étapes essentielles : (i) la récupération de la fraction Glob par précipitation isoélectrique ; le culot était remis en suspension à pH 8 en présence de 5% de sulfate de potassium, (ii) : puis une purification par ultrafiltration, diafiltration et un séchage par lyophilisation.

III.1.2 Composition physicochimique et rendement d'extraction des protéines

Les résultats de l'analyse physicochimique de la farine de pois utilisée, montre que cette dernière était composée de ~92% de matière sèche dont 21,3% sont des matières protéiques. La composition en azote de chaque fraction est présentée dans le **Tableau.III.1**.

Tableau.III.1. Composition de la farine de pois en fractions azotées.

% dans l'azote total	Valeurs mesurées	Valeurs littérature (Gueguen et Barbot 1988)
Azote non protéique	15,2±0,2	20,2 (14,9-30,4)
Azote de fraction Albumine	22,2±0,1	21,3 (12,3-28,9)
Azote de fraction Globuline	46,5±0,9	58,9 (33,6-65,4)
Azote insoluble	16,1±0,4	20,5 (12-38,1)

La détermination de l'azote non protéique est obtenue par calcul de la teneur en azote présent dans les surnageants des fractions albumines et globulines après précipitation au TCA. L'azote insoluble est calculé par différence de la teneur totale en protéines dans la farine et de la somme des fractions (globulines + albumines + azote non protéique). Les valeurs des différentes matières azotées obtenues sont en accord avec les teneurs retrouvées dans la littérature (**Gueguen & Barbot 1988**).

Tableau.III.2. Composition physicochimique de la farine et la fraction globulines.

Echantillons	Humidité	Protéine	Lipide	Cendres	Glucide ^a
	(%)	(%)*	(%)*	(%)*	(%)*
Farine de pois	8,6± 0,3	21,3± 0,3	2,4± 0,1	2,6±0,1	73,7
Globuline	3,5± 0,1	93,5± 3,8	0,7± 0,1	4,3±0	1,5

* % calculé sur une base de matière sèche,

^a Calculé par différence de 100%.

La composition de la fraction purifiée de globuline est présentée dans le **Tableau.III.2**. La teneur en protéines et en lipides (sur une base de matière sèche) dans l'extrait de Glob lyophilisé était respectivement d'environ 93,5% et moins de 1,0%.

Il est très important de signaler que la présence d'une faible quantité de matière grasse dans l'isolat de globulines, réduit les interactions lipides-protéines (**Shand, et al. 2007**), et que leur présence en grande quantité modifierait la solubilité dans l'eau et augmenteraient la turbidité des suspensions protéiques, comme dans le cas des solutions protéiques de soja (**Li, et al. 2007**). Le taux protéique dans cette fraction était en accord avec les valeurs obtenues dans la littérature.

Tableau.III.3. Rendement d'extraction de fractions de globulines.

	(%) Glob dans la farine	(%) Glob dans l'isolat purifié	Rendement d'extraction (%)
Globuline	46,5±0,9	30,4±0,4	65,3

Le rendement d'extraction de la fraction Glob à partir de 500 g de farine, était d'environ 65%; celui-ci est obtenu en faisant le rapport entre la quantité de protéines de l'isolat purifié et de la farine de pois. Ce résultat est proche de celui décrit dans la littérature (**Créviu, et al. 1996**).

III.1.3. Profils SDS-PAGE

La **Figure.III.1**, montre le profil SDS-PAGE indiquant la composition polypeptidique de la farine de pois et de la fraction Glob après extraction dans les conditions non réductrices et réductrices. L'intensité des bandes est plus prononcée pour les globulines extraites (pistes 3, 4), du fait d'une concentration protéique plus importante par rapport à celle de la farine de pois (pistes 1, 2).

Dans des conditions réductrices, les profils protéiques présentaient des bandes de poids moléculaires (Mw) variant entre 19 et 94 kDa. En comparant les profils électrophorétiques de cette fraction Glob (piste 3, 4) et ceux de la farine de pois (piste 1, 2), on observe la disparition d'une fraction de 26 kDa attribuée à l'albumine PA2. Celle-ci a été éliminée au moment de l'extraction.

Les Glob de pois sont composées de : (i) légumine $L_{(\alpha,\beta)}$ (60 kDa), qui est dissociée en sous unités L_{α} , $L_{\beta 1}$ et $L_{\beta 2}$ dans les conditions réductrices (Croy, et al. 1980a; Gueguen & Barbot 1988; Liang & Tang 2013; Mession, et al. 2015); (ii) les vicilines qui sont considérées comme les polypeptides majoritaires de Glob de pois (polypeptides de 50, 35, 33, 30 kDa), avec la présence d'une fraction minoritaire de viciline de 19 kDa (Gatehouse, et al. 1982); (iii) la fraction de convicine qui est considérée comme le troisième polypeptide de stockage (71 kDa) (Croy, et al. 1980b; Liang & Tang 2013).

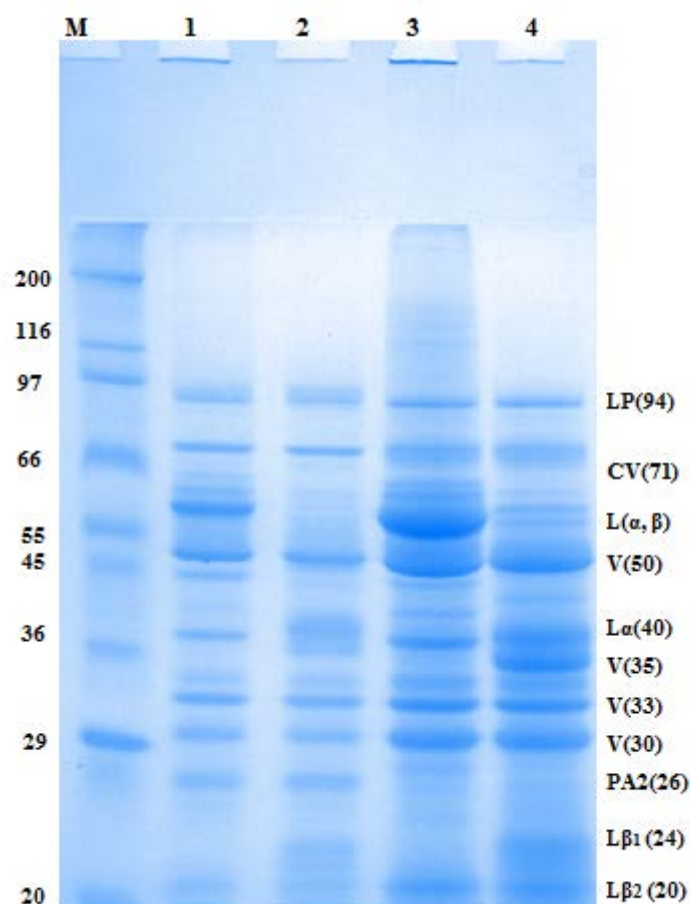


Figure.III.1. Profil SDS-PAGE des fractions globulines (10 μ g/ μ l) en conditions non dénaturantes (SDS), en conditions dénaturantes (SDS+DTT). M: Marqueurs de masse molaire (kDa); Piste 1, 2: Farine de pois (+SDS), (SDS+DTT); Piste 3, 4: Globulines de pois extraites (+SDS), (SDS+DTT); L (α , β): légumine; L_{α} : polypeptide acide; L_{β} : Polypeptide basique; V : Vicilines; CV: convicilines; LP: lipoxigénase; PA2: albumine.

D'après l'analyse densitométrique des bandes de migration, la teneur relative en protéines de la fraction globuline (pureté) extraite avoisinait 93% ; ce résultat était légèrement différent de celui obtenu par le dosage Kjeldahl. Cela peut être dû à la présence de l'azote non protéique, qui ne se détecte pas par SDS-PAGE. Les sous unités acide α (40 kDa) et basique

L β _{1,2} (20-24 kDa) représentaient ~28% ; l'ensemble des fractions vicilines représentait au total ~58%, la convicine (71 kDa) ~ 9%, et ~5% de lipoxigénase (LP 94 KDa) qui est une protéine généralement associée à la fraction albumine. Les profils SDS-PAGE de la farine et de l'extrait de globulines de pois sont similaires à ceux de la littérature (**Liang & Tang 2013; Messin, et al. 2015; Messin, et al. 2013; Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010**).

La présence d'agrégats de poids moléculaires supérieurs à 200 kDa (piste 3) est également observée sur le gel de concentration et sur la surface de séparation. Ces agrégats sont vraisemblablement formés lors de l'extraction (**Gueguen 1983; Karaca, et al. 2011**) et dus à la faible force ionique. Dans ces conditions l'association et l'agréation irréversible de la légumine serait envisagée au-dessous de 0,05M NaCl (**Gueguen, et al. 1988**).

III.1.4. Solubilité de Glob en fonction du pH et de la force ionique

Les propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires sont des facteurs très importants dans la transformation et la formulation des aliments. Les protéines de pois possèdent aussi certaines propriétés comme la solubilité, qui est très recherchée dans le domaine alimentaire. Une meilleure hydratation et solubilisation des protéines en solution affecte positivement l'ensemble des propriétés technofonctionnelles des protéines.

La solubilité est régie par des interactions protéine-protéine et protéine-solvant conduisant soit à une précipitation, soit à une solubilisation des protéines (**Damodaran 1996**). D'une manière générale, la solubilité des protéines est affectée par plusieurs facteurs déterminants, dont des facteurs intrinsèques comme la nature et la composition en acides aminés de la protéine (résidus hydrophiles et hydrophobes), et leur distribution à la surface de la protéine (**Kimura, et al. 2008**) ; les facteurs extrinsèques, qui sont liés aux paramètres environnementaux comme le pH, jouent un rôle primordial sur la solubilité des protéines.

La variation du pH du milieu provoque une modification de l'ionisation des divers groupes acido-basiques à la surface des protéines et la charge globale est affectée (**Deng, et al. 2011**). Cependant elle peut dépendre aussi d'autres facteurs tels que les conditions de préparation de la protéine et la méthode d'extraction (**Boye, et al. 2010; Koyoro & Powers 1987; Papalamprou, et al. 2009**), ou encore la force ionique du milieu et la procédure de séchage de la solution protéique afin d'obtenir une poudre purifiée (**Deng, et al. 2011; Gueguen 1983; Gueguen, et al. 1988**).

Dans notre étude, nous avons mesuré la solubilité des fractions Glob en fonction du pH, et de la force ionique respectivement à 5 et 100 mM NaCl.

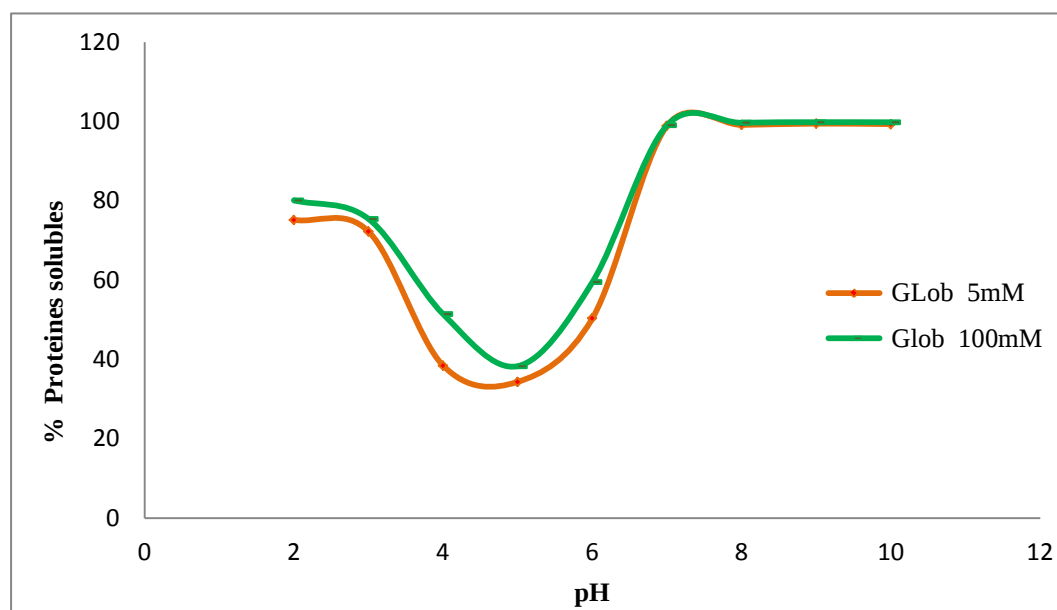


Figure.III.2. Solubilité des globulines en fonction du pH et de la force ionique (à 5 et 100 mM NaCl) pour des suspensions à 2% (m/m) initialement d'isolats de globulines de pois préparés par précipitation acide, à partir de farine de pois préalablement délipidée.

La **Figure.III.2.** montre l'évolution de la solubilité de la fraction de globulines en fonction du pH et de la force ionique. La solubilité des globulines de pois présente un profil en forme de (U) caractérisé par une solubilité moyennement élevée aux pH acides (de 75 à 80% respectivement pour une force ionique de 5 et 100 mM NaCl à pH 2) et élevée aux pH alcalins (de 98 à 99,5% respectivement pour une force ionique de 5 et 100 mM NaCl à pH 10), et une solubilité minimale autour du point isoélectrique (de 34 à 38% respectivement pour une force ionique de 5 et 100 mM NaCl à pH 4,8). Ce profil est similaire à d'autres profils de solubilité de globulines de soja et de protéines de légumineuses (pois chiches et lentilles) (**Boye, et al. 2010; Karaca, et al. 2011**). Généralement une solubilité élevée suggère que les protéines extraites sont dans un état plutôt natif (**Fuhrmeister & Meuser 2003**).

Les profils de solubilité obtenus en fonction du pH et la force ionique, pour une concentration de 2% (m/m) de globulines, sont légèrement plus élevés que ceux décrits dans la littérature (**Mession, et al. 2012**). Nous pouvons expliquer cette augmentation de solubilité par la préparation de la matière première, car avant lyophilisation des solutions protéiques un

ajustement de pH à 7,2 a été effectué, suivi par une centrifugation. Donc lors de la re-solubilisation des Glob, une meilleure solubilité sera attendue.

Comme la plupart des protéines, la solubilité est fonction du pH et donc de la charge nette de la protéine. Au pH isoélectrique, la protéine possède un équilibre entre charges positives que négatives, qui favorisent l'affinité et l'interaction entre protéines au détriment de l'interaction protéine-solvant, favorisant par la suite le repliement de la protéine et minimisant ainsi la solubilité. Aux pH acide ou basique, la protéine est respectivement chargée positivement et négativement. Cette différence de charge nette augmente les forces de répulsions entre les particules, favorisant ainsi l'interaction protéine-solvant qui se traduit par une meilleure solubilité.

De plus, en milieu acide, la rupture de la structure quaternaire des globulines s'opère par la dissociation des sous unités de légumine ($\alpha\beta$) du fait de la protonation des groupes carboxyliques (**Lakemond, et al. 2000**). Cette dissociation est complète à un pH autour de 2,8 (**Subirade, et al. 1992**), conduisant à la dénaturation des protéines.

La **Figure.III.2.** montre également l'effet de la force ionique (100 mM NaCl) sur la solubilité des globulines à différents pH; il est important de noter qu'une augmentation de solubilité a été observée dans la gamme de pH étudiée. Cette légère augmentation de solubilité est due à l'effet de salting-in.

III. 1.5. Teneurs de Glob en S⁻ et SS

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la formation de ponts disulfures, qui peuvent être impliqués dans des interactions spécifiques. Ces liaisons proviennent du partage des électrons entre deux atomes d'une même molécule (liaison intramoléculaire) ou deux molécules différentes (liaison intermoléculaire); le partage de ces électrons se fait entre les groupements thiols des résidus de cystéines.

La quantification en thiols libres (S⁻) ainsi qu'en ponts disulfures (SS) des globulines extraites est présentée dans le **Tableau.III.4**. Les résultats montrent que la concentration en thiol dans la fraction Glob à l'état natif était similaire dans les solutions protéiques préparées à 5 ou 100 mM NaCl.

Tableau.III.4. Teneurs en groupements (S⁻) et en ponts disulfures (SS) dans les fractions purifiées de globulines à un pH de 7,2 avec une force ionique de 5 mM et 100 mM de NaCl, et à une concentration de 2% (m/m) de Glob.

Echantillons	S ⁻ totaux ($\mu\text{mol/g}$ protéine)	S ⁻ libres ($\mu\text{mol/g}$ protéine)	SS ($\mu\text{mol/g}$ protéine)
Glob à 5 mM NaCl	10,5 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1
Glob à 100 mM NaCl	10,8 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,2

La source principale d'acides aminés soufrés des globulines de pois : est (i) la légumine (**O'Kane, et al. 2005**), qui est un hexamère dont chaque sous-unité est constituée de deux polypeptides acide et basique de 40 et 20 kDa respectivement, reliés entre eux par un pont disulfure (**Croy, et al. 1980a**), et (ii) éventuellement la convicine qui peut contenir un ou deux résidus de cystéine par molécule (**Croy, et al. 1980b; Messian, et al. 2015; O'Kane, et al. 2005**), contrairement à la viciline qui ne possède pas d'acide aminé soufré (**Croy, et al. 1980b; O'Kane, et al. 2004**).

La teneur mesurée en groupes S⁻ libres de Glob à une concentration de 2% m/m ($\sim$ 2,1 à 2,3 $\mu\text{mol/g}$ protéine respectivement pour une force ionique de 5 et 100 mM NaCl) était proche de celle reportée par **Messian, et al. (2015)**. La teneur des Glob natives en pont disulfures, était de $\sim$ 4,2 $\mu\text{mol/g}$ protéine, indiquant que la plupart des résidus de cystéine existaient sous forme de liaisons disulfures entre les sous-unités de légumine.

O'Kane, et al. (2015) ont indiqué que la teneur des groupes S⁻ des globulines de pois peut varier entre 3 et 70 $\mu\text{mol S}^-$ libre/ g de protéine selon les cultivars, ce qui suggère que les globulines de pois utilisées dans notre étude ont une faible teneur en acides aminés soufrés puisque la teneur totale en S⁻ mesurée ne dépasse pas 11 $\mu\text{mol/g}$ de protéine.

III.1.6. Détermination de l'hydrophobicité et la charge de surface de la Glob

L'hydrophobicité de surface (H_0) est l'une des caractéristiques structurales des protéines; elle est considérée comme indice pour évaluer le changement de conformation d'une protéine; ainsi elle peut affecter les propriétés fonctionnelles des protéines et déterminer la solubilité de la protéine (**Gueguen 1989; Kato & Nakai 1980**).

Durant ce travail de thèse, nous avons suivi l'évolution de l'hydrophobicité des différents échantillons étudiés afin de pouvoir comparer et discuter les différents changements qui peuvent survenir entre les protéines natives et les agrégats solubles formés. Les interactions hydrophobes intermoléculaires sont des liaisons non covalentes qui peuvent conduire à l'agrégation des protéines et la formation de complexes (**De Wit & Van Kessel 1996**).

D'après la littérature, la sous-unité protéique L β du monomère de légumine (L $\alpha\beta$) est un polypeptide hydrophobe qui est situé dans le noyau de la structure hexamérique de la légumine, tandis que L α plutôt hydrophile est orienté vers la surface (**Gueguen 1989; Marcone, et al. 1998**). Ces sous unités de légumine sont très hydrophobes (2 fois plus) comparativement à la fraction de viciline (**Liang & Tang 2013**).

Tableau.III.5. Hydrophobicité de surface (H_0) et la charge de surface (potentiel Zeta (ζ)) des fractions de globulines natives à 2% (m/m) et à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl à pH 7,2.

	Glob à 5 mM NaCl	Glob à 100 mM NaCl
$H_0 (\times 10^6)$ (u.a.)	$2,39 \pm 0,1$	$2,45 \pm 0,2$
(ζ) potentiel (mV)	$-17,34 \pm 0,41$	$-10,71 \pm 0,05$

Le **Tableau.III.5.** présente les valeurs d'hydrophobicité de surface (H_0) des globulines natives à une concentration de 2% (m/m) et à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl. Les valeurs de (H_0) passent de $\sim 2,39 \times 10^6$ à $2,45 \times 10^6$ (u.a) respectivement pour des suspensions protéiques préparées à une force ionique de 5 à 100 mM NaCl. Les résultats obtenus étaient proches de ceux rapportés dans les travaux de **Stone, et al. 2015**.

Des travaux précédents (**Karaca, et al. 2011; Stone, et al. 2015**) ont indiqué qu'un (H_0) élevé peut être attribué à la méthode d'extraction. Celle-ci affecte sensiblement la solubilité et l'hydrophobicité des globulines de pois à l'état natif. Cette constatation est cohérente avec nos expériences, où l'extraction était basée sur une précipitation acide (à pH 4,9), suivie d'une solubilisation alcaline (à pH 8), avec un ajustement à pH 7,2 en fin de diafiltration. Cette opération tend à augmenter l'hydrophobicité des protéines natives, cela par l'exposition des groupes hydrophobes qui étaient enfouis au cœur de la molécule. **Mwasaru, et al. (1999)** ont conclu que le type et les conditions d'extraction affectent la conformation des

protéines, principalement par interactions électrostatiques, et cela conduit à des différences dans les résidus hydrophobes exposés. D'autre part, il a été mentionné dans la littérature, qu'une teneur élevée en globulines dans l'isolat purifié, affecte sensiblement H_0 (**Karaca, et al. 2011**). Les résultats de composition chimique et l'électrophorèse de la fraction Glob discutés précédemment ont été en accord avec les auteurs cités ci-dessus.

Les valeurs de la charge de surface des fractions de globulines natives (potentiel Zeta, ζ) sont présentées dans le **Tableau.III.5**. Les résultats obtenus étaient proches de ceux obtenus dans les travaux de **Stone, et al. 2015**. L'augmentation du pH au-dessus du point isoélectrique conduit à un potentiel zeta (ζ) de la protéine de plus en plus négatif, et inversement si le pH diminue au-dessous du point isoélectrique, la charge de surface devient positive. En plus du pH de la solution, la concentration et le type de sel présents dans la solution affectent la charge électrique des biomolécules.

A une faible force ionique (5 mM), toutes les particules de protéines en suspension sont chargées négativement (-17,34 mV), ce qui favorise une haute répulsion électrostatique entre les molécules, conduisant au maintien de la dispersion protéique dans le système. Les suspensions protéiques préparées à une force ionique élevée (100 mM NaCl) présentent une charge de surface moins élevée qui atteint -10,71 mV ; cela peut s'expliquer par l'effet d'écrantage des ions sur la charge de surface des protéines qui réduit leur potentiel (ζ). La répulsion entre particules est donc influencée par la variation de la force ionique, conduisant à une augmentation possible des interactions protéines-protéines et l'agrégation en cas de chauffage.

III.1.7. Propriétés thermiques de la fraction de globuline

Au cours de nos travaux, nous avons mené l'étude des propriétés thermiques des fractions protéiques natives obtenues. Les mesures de DSC ont permis d'une part de vérifier que l'étape d'extraction et de purification n'avaient pas d'impact sur la structure des protéines, et d'autre part, de déterminer la température optimale de dénaturation des protéines seules, et ainsi de choisir la température adéquate permettant de préparer les agrégats solubles mixtes.

Les thermogrammes et les données thermiques des fractions Glob obtenues par analyse enthalpique différentielle (DSC) sont présentés dans les **Figures.III.3.** et dans le **Tableau.III.6**. Dans le cas de la Glob préparée à faible force ionique (5mM NaCl), une seule transition endothermique relativement large a été observée, avec la présence d'un petit

chevauchement dans le même pic. La température de dénaturation obtenue (T_d) était de $\sim 75,62$ °C. Ce chevauchement correspond à la dénaturation simultanée dans le même domaine de températures des fractions de viciline (pic majoritaire) et légumine respectivement (**Mession, et al. 2012**). Un pic endothermique majeur reflète une dénaturation plutôt coopérative, du fait que les différents niveaux de structure et les domaines conformationnels sont maintenus par des forces interdépendantes, en particulier pour les légumine (**Tzitzikas, et al. 2006**).

Il a été observé que la dénaturation des Glob de pois est irréversible; cela est mesuré par l'absence de transition lors d'un nouveau chauffage du même échantillon (résultats non montrés).

Tableau.III.6. Propriétés thermiques des fractions de Glob préparées à pH 7,2 à différentes forces ioniques.

Echantillons	T_{onset} (°C)	T_d (°C) Pic1	T_d (°C) Pic2	ΔH_d (J/g prot)
Glob à 5mM NaCl	$64,22 \pm 0,79$	$75,62 \pm 0,6$	$80,22 \pm 0,25$	$14,44 \pm 0,17$
Glob à 100mM NaCl	$71,24 \pm 0,6$	$78,16 \pm 0,07$	$85,16 \pm 0,16$	$15,41 \pm 0,09$

Le profil de dénaturation des globulines préparées à une force ionique élevée (100 mM NaCl) (**Tableau.III.6.** et **Figure.III.3.**) indique une transition thermique, avec un thermogramme plus large, ainsi que la présence d'un chevauchement plus important par rapport au cas de la fraction Glob préparée à 5 mM NaCl. Les deux pics sont attribués aux vicilines et à la légumine respectivement.

L'augmentation des valeurs de T_d de $\sim 75,46$ à $78,16$ °C et de $\sim 80,22$ à $85,16$ °C respectivement pour ces fractions est dû à l'ajout de NaCl, qui réduit par écrantage des charges les répulsions inter- et intra-chaînes, ce qui tendrait à stabiliser la structure et une conformation plus compacte de la protéine. L'augmentation de T_d en fonction de l'ajout de sel a été rapporté précédemment dans différents travaux pour les protéines de pois (**Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010**) et pour de la légumine de fève (**Zheng, et al. 1993**).

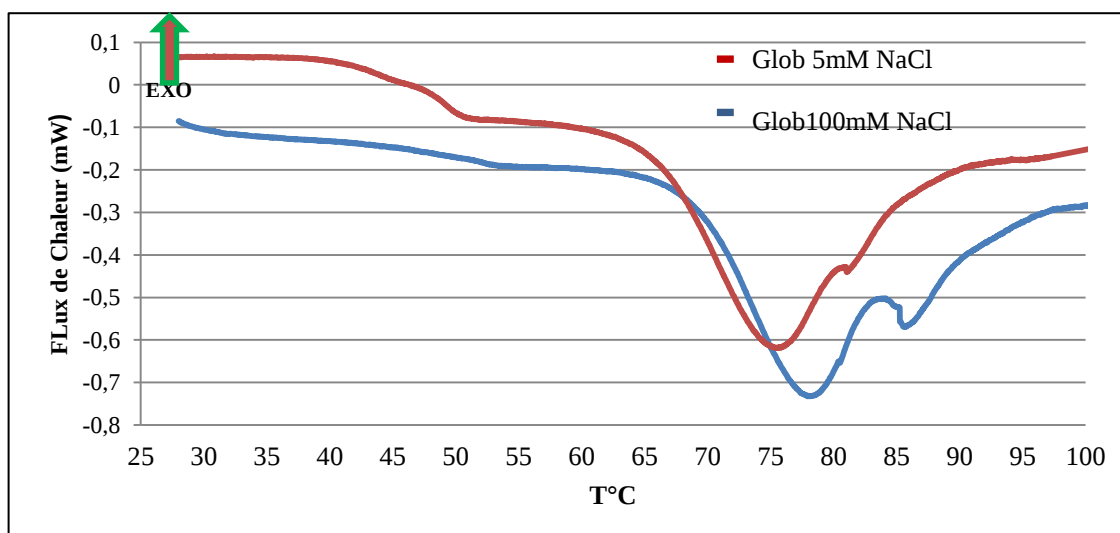


Figure.III.3. Thermogrammes de fractions Globulines à 10% (m/m) chauffées à 1 °C/min, à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl, à pH 7,2,

A une force ionique élevée, les températures T_d sont dans le même ordre de grandeur que celles mesurées par (Messiou, et al. 2012; Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010); la température T_d de Glob préparée à faible force ionique est quant à elle inférieure à la température reportée par les mêmes auteurs. Cela peut être dû aux conditions préparatoires de la matière première, ainsi qu'à la rampe de température utilisée pour l'analyse, avec un chauffage de 1°C/min dans notre cas contre 10°C/min dans les études précédemment citées.

Les valeurs d'enthalpie de dénaturation (ΔH_d) des globulines préparées à faible force ionique, étaient dans le même ordre de grandeur que celles obtenues par Sun et al, (2010) et Messiou et al, (2012), tandis que ces valeurs étaient supérieures à celles obtenues par Shand et al, (2007). Cette augmentation de ΔH_d dans notre étude est une indication que les fractions de globulines produites étaient natives et que l'opération d'extraction a peu affecté la conformation des protéines. Shand, et al. (2007) ont rapporté que l'extraction des globulines à partir d'un isolat de pois commercial conduit à des valeurs de (ΔH_d) faibles (globulines relativement dénaturées).

III.2. Préparation et caractérisation de la β -lactoglobuline (β lg)

III.2.1. Méthode de purification

Nous avons adopté le protocole d'extraction décrit par Konard, et al. (2000) avec quelques modifications. D'une manière générale, le procédé est basé sur deux étapes

essentielles : (i) la récupération de la fraction β lg par une précipitation sélective par l'ajout de TCA. La β lg est la molécule la moins sensible à ce changement brutal de pH lors de l'acidification par TCA ; en contrepartie toutes les fractions protéiques telles que la caséine, α -lactalbumine et le BSA vont précipiter (**Fox, et al. 1967**). Le surnageant est récupéré et considéré comme la fraction β lg, (ii) : une dialyse sera effectuée contre l'eau distillée, ensuite contre un tampon de 5mM NaCl ; une lyophilisation de solution protéique est réalisée pour récupérer l'isolat purifié de β lg.

III.2.2. Composition physico-chimique et rendement d'extraction de β lg

La composition physicochimique de l'isolat de lactosérum utilisé comme matière première et la fraction enrichie de β lg est présentée dans le **Tableau.III.7**.

Tableau.III.7. Composition de l'isolat de lactosérum en fractions azotées

Echantillons	Humidité (%)	Protéine (%)*	Lipide (%)*	Cendres (%)*	Carbohydrate ^a (%)
Promilk 802FB (Valeurs fournies par INGREDIA)	5	77	0,5	4	18,5
Promilk 802FB (Valeurs mesurées)	5,14± 0,1	77,8± 2,3	0,8± 0	3,6± 0	17,8
βlg	5,2± 0,3	92± 2,3	0,8± 0,1	3,2± 0,2	3,9

* % calculé sur une base de matière sèche,

^a Calculé par différence de 100%,

Après l'étape de dialyse et ajustement du pH à 7,2, nous avons calculé la concentration de β lg dans la solution protéique qui était 36 g.l⁻¹ par la mesure de la densité optique (à 280 nm), en utilisant le spectrophotomètre UV. Les résultats d'analyse montrent que l'isolat de lactosérum était composé de ~95% de matière sèche dont ~78 % sont des matières protéiques ; les valeurs mesurées des différents composants de l'isolat de lactosérum étaient proches de celles fournies par Ingredia.

La fraction purifiée de β lg est composée de ~5% d'humidité, sur la base de la matière protéique sèche (~95%) elle contient ~92% de protéines, ~0,8 et 3% de matière grasse et de cendres respectivement. Ces valeurs étaient en accord avec celles trouvées par **Konrad, et al, (2000)**.

Tableau.III.8. Composition en fractions azotées de la β lg,

% dans l'azote total	Valeurs mesurées	Valeurs littérature
Azote non protéique (NPN)	7,6 $\pm$ 0,3	7-12
Azote protéique (NP)	92 $\pm$ 0,8	89-93
Azote insoluble*	0,4 $\pm$ 0,2	-

* Calculé par différence de 100%

La composition en azote de la fraction purifiée de β lg est présentée dans le **Tableau.III.8**. La détermination de l'azote non protéique dans les fractions de β lg purifiées, est effectuée de la même façon que pour les fractions de Globulines (**III.1** et **2**). La seule différence réside dans le facteur de conversion des protéines, qui est de 6,38 pour les protéines laitières et de 6,25 pour les protéines végétales. Les valeurs des différentes matières azotées obtenues sont en accord avec les proportions calculées dans la littérature (**Funtenberger, et al. 1997; Konrad, et al. 2000**).

Tableau.III.9. Rendement d'extraction de β lg à partir de l'isolat de lactosérum.

protéine obtenu de β lg	Valeur expérimentale (%)	Valeur littérature (%)
β lg	33,12 $\pm$ 1,2	55,2 $\pm$ 0,9

Le rendement d'extraction des fractions enrichies en β lg était de 55% ; cette valeur a été calculée comme étant le rapport entre la quantité de protéines de l'isolat final et la quantité de protéine initiale dans la poudre de lactosérum. Les résultats sont en adéquation avec les travaux de **Konrad et al, (2000)**.

III.2.3. Profils SDS-PAGE de β lg

La **Figure.III.4** montre le profil SDS-PAGE, indiquant la composition polypeptidique de l'isolat de lactosérum et de β lg dans les conditions non réductrices et réductrices.

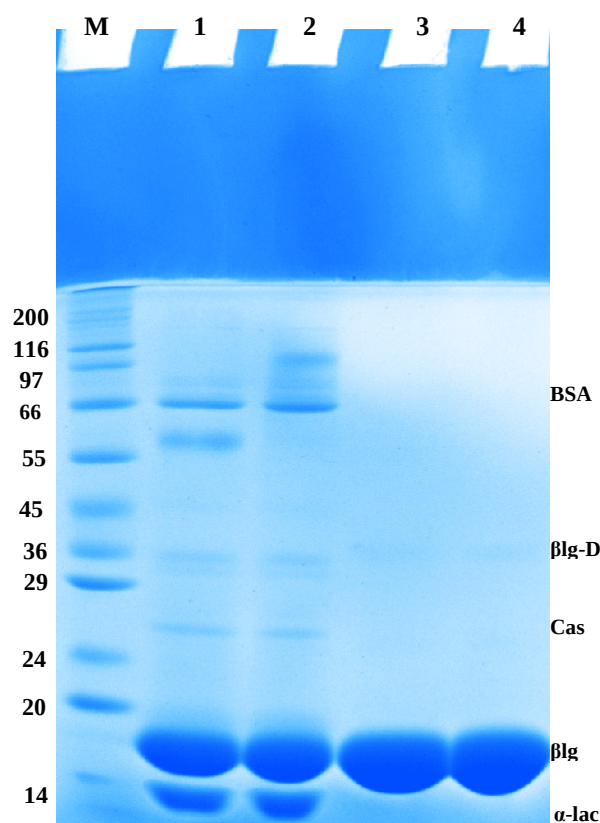


Figure.III.4. Profil SDS-PAGE des fractions protéiques de la poudre d'isolat de lactosérum et de l'extrait purifié de β lg (10 μ g/ μ l) en conditions non dénaturantes (SDS) et dénaturantes réductrices (SDS+DTT). Puits 1,2 : isolat de lactosérum (+SDS), (SDS+DTT) ; Puits 3, 4 : l'extrait purifié de β lg (+SDS), (SDS+DTT). M : Marqueurs de masse molaire (kDa); Bsa : Bovine Sérum Albumine; Cas : caséine; β lg : β -lactoglobuline; β lg-D : β -lactoglobuline en dimère; α -lac ; α -lactalbumine,

La pureté de fraction de β lg obtenue a été vérifiée par électrophorèse SDS-page (**Figure.III.4.** puits 3, 4). Les puits 1, 2 présentent des bandes de migration caractéristiques allant de 14 kDa à 66 kDa pour l'isolat de lactosérum commercial. La bande située à 66 kDa correspond principalement à la BSA et celle à 36 kDa à la β lg sous forme de dimère. Des traces de caséines sont également observées aux alentours des 24 kDa.

La β lg sous forme monomérique a été observée à 18 kDa, et α -lactalbumine à 14 kDa. La poudre purifiée (puits 3, 4) contient principalement (~99%) de β lg sous forme monomérique et des traces de β lg en dimère (~ 1%) dans le puits 3, qui correspond à de la β lg dissociée. Ce résultat confirme que l'isolement de β lg et la purification ont été correctement effectués, après l'élimination de toute autre fraction protéique sérique.

A pH 7, à température ambiante et en concentration suffisante, la β lg existerait en monomères et dimères en équilibre impliquant des liaisons hydrogène. La méthode de purification utilisée dans cette étude ne nous permet pas de distinguer entre les deux variants de β lg A et B (**Konrard, et al. 2000**); il a été signalé que le comportement de ces deux variants est similaire dans la formation des agrégats solubles (**Bauer, et al. 1998**).

III.2.4. Solubilité de β lg en fonction du pH et de la force ionique

Les profils de solubilité de la fraction de β lg isolée en fonction du pH et de la force ionique, sont présentés dans la **Figure.III.5**. Les valeurs de solubilité étaient de l'ordre de ~95 et 96,5% (pH 2) et entre ~98 et 99% (pH 9) pour les solutions protéiques respectivement préparées à 5 et 100 mM NaCl à 25°C. Ces valeurs élevées reflètent une forte teneur de l'isolat purifié en β lg natives, ainsi qu'une faible teneur en azote insoluble (**Tableau.III.9**). Les profils obtenus de solubilité étaient proches de ceux reportés dans les études précédentes (**Funtenerberger, et al. 1995**).

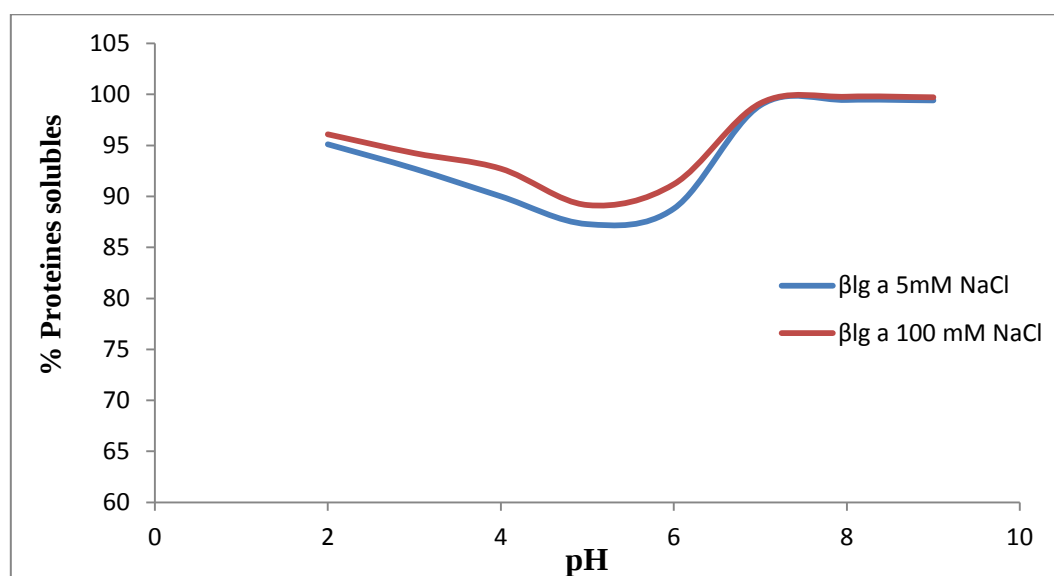


Figure.III.5. Solubilité de β lg en fonction du pH et de la force ionique (5 et 100 mM NaCl) pour des suspensions à 1% (m/m) d'isolats purifiés de β lg,

Des valeurs de solubilités relativement faibles (~87 et 89%), ont été observées dans une gamme de pH de 4-6 proche du pH isoélectrique de β lg (pI 5,2), où les interactions protéines-protéines sont favorisées. Une amélioration de la solubilité a été également observée pour les solutions de β lg préparées à 100 mM NaCl par l'effet de salting-in.

III.2.5. Teneurs de la β lg purifiée en S^- et SS

Les teneurs en thiols libres (S^-) ainsi qu'en ponts disulfures (SS) de la fraction native de β lg sont présentées dans le **Tableau.III.10**. Il n'a pas été observé de différence significative entre les échantillons préparés à 5 mM et à 100 mM. Ces résultats étaient proches de ceux rapportés par **Funtenberger, et al. (1997)**.

Tableau.III.10. Teneurs en groupements (S^-) et en ponts disulfures (SS) dans les fractions purifiées de β lg, à un pH de 7,2, à une force ionique de 5 mM et 100 mM de NaCl, et à une concentration à 2% (m/m) de β lg.

Echantillons	S^- totaux ($\mu\text{mol/g}$ protéine)	S^- libres ($\mu\text{mol/g}$ protéine)	SS ($\mu\text{mol/g}$ protéine)
β lg à 5 mM NaCl	247 $\pm$ 0,5	42,5 $\pm$ 0,2	102,5 $\pm$ 0,3
β lg à 100 mM NaCl	248 $\pm$ 2,1	41,9 $\pm$ 0,2	103 $\pm$ 0,3

Les concentrations de β lg en thiols libres et en ponts disulfures étaient respectivement de ~ 42 et $\sim 103 \mu\text{mol/g}$ protéine quelle que soit la force ionique. Ces valeurs sont de 20 jusqu'à 30 fois plus élevées que celles mesurées respectivement pour S^- libre et SS des globulines de pois à l'état natif (**Tableau.III.4**).

La différence de concentration est due à la différence de composition des deux protéines en acides aminés soufrés, car la légumine possède environ quatre méthionine, et de deux à sept résidus cystéine par sous-unité de 60 kDa suivant les cultivars (**Croy, et al. 1980b; O'Kane, et al. 2004**). La β -lactoglobuline possède deux ponts disulfures au niveau des cystéines C106-C119 et C66-C160 qui sont des liaisons intramoléculaires, et une cystéine libre (C121) (**Hoffmann & van Mil 1997; McKenzie, et al. 1972**). Cette cystéine libre participe aux réactions d'oxydation et d'échange thiol / disulfure, et conduit à la formation de liaisons disulfures intermoléculaires. Ces liaisons jouent un rôle très important dans l'agrégation thermique et la gélification de β lg (**Creamer, et al. 2004; Hoffmann & van Mil 1997**).

III.2.6. Détermination de l'hydrophobicité et la charge de surface de la fraction purifiée de β lg

Les valeurs moyennes d'hydrophobicité de surface et du potentiel Zeta (ζ) des fractions natives de β lg, en fonction de la force ionique, sont présentées dans le **Tableau.III.11**.

Tableau.III.11. Hydrophobicité de surface et potentiel Zeta (ζ) des fractions natives de β lg à 2% (m/m) à 5 et 100 mM NaCl à pH 7,2.

	β lg à 5 mM NaCl	β lg à 100 mM NaCl
H_0 (Pente $\times 10^6$) (u,a)	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2
potentiel (ζ) (mV)	-17,12 $\pm$ 0,41	-10,49 $\pm$ 0,2

Les résultats montrent que l'ajout de NaCl dans les solutions protéiques de β lg natives n'affecte pas l'hydrophobicité de surface des protéines natives (de l'ordre de 1,0 10^6 (u,a)). Des résultats proches ont été rapportés dans les travaux de **Ryan, et al. (2012)**.

Nous avons observé également que les valeurs de H_0 des globulines natives étaient supérieures (deux fois plus élevées que celles de la β lg native) quelle que soit la force ionique utilisée. Cela peut être expliqué par la différence de composition en acides aminés, la structure, la charge électrique et par le réarrangement stérique des protéines (**Haskard & Li-Chan 1998**). L'influence des conditions opératoires lors de l'extraction et la préparation des fractions purifiées de Glob jouent également un rôle primordial dans la mesure de ce paramètre (Cf. **Chapitre III.1.5**).

De nombreux auteurs (**Alizadeh-Pasdar & Li-Chan 2000; Haskard & Li-Chan 1998**) ont démontré que l'hydrophobicité de la β lg est très élevée à des pH acides. Ces auteurs suggèrent que la présence ou l'absence des charges électrostatiques, peuvent affecter les valeurs d'hydrophobicité de la protéine dans différentes conditions de pH.

Les mesures de la charge de surfaces (potentiel Zeta) des fractions de β lg natives préparées à différentes forces ionique sont présentées dans le **Tableau.III.11**. La valeur du potentiel Zeta (ζ) de β lg mesurée à faible force ionique (5 mM), était plus faible que celle mesurée à force ionique élevée (100mM). Cette diminution (de -17,12 à -10,49 mV) est due à

l'effet d'écrantage des charges de surface des protéines qui réduit les répulsions électrostatiques entre protéines dans le système. Les résultats obtenus étaient proches de ceux rapportés dans les travaux de **Rayan, et al. (2012)**. Ces auteurs ont constaté que les valeurs du potentiel Zeta (ζ) de β lg à l'état natif, étaient dans le même ordre de grandeur (~ -17 et -10 mV) pour des solutions préparées à 5 et 100 mM NaCl respectivement.

III.2.7. Propriétés thermiques des fractions purifiées de β lg

Les thermogrammes des fractions de β lg obtenues par analyse enthalpique différentielle sont présentés dans le **Tableau.III.12.** et les **Figures.III.6a-b.** Les thermogrammes obtenus montrent une seule transition endothermique. Cela confirme les résultats obtenus par SDS-PAGE (**Figure.III.4.**) sur la pureté des fractions extraites. Il est important de signaler que la transition endothermique de β lg était plus étroite que celle observée pour la fraction de globulines de pois (**Figure.III.3.**).

Les résultats indiquent que la dénaturation thermique de β lg est irréversible. Cela se traduit par l'absence de transition lors d'un nouveau cycle de chauffage des échantillons (données non montrées).

Tableau.III.12. Températures et énergie de dénaturation des fractions de β lg préparées à pH 7,2 et à différentes forces ioniques.

Echantillons	T_{onset} (°C)	T_d (°C)	ΔH_d (J/g _{prot})
βlg a 5mM NaCl	68,18± 0,79	70,79± 0,77	7,96± 0,25
βlg 100mM NaCl	68,58± 0,09	73,74± 0,2	9,43± 0,02

La thermodénaturation des fractions de β lg préparées à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl respectivement, ont donné des valeurs expérimentales de T_d comprises entre ~ 72 à 74 °C. L'augmentation de la stabilité thermique de β lg préparée à une force ionique élevée, est due à l'effet du sel (cation Na^+) sur l'écrantage des charges négatives inter- et intra-chaînes qui tendent à stabiliser la structure protéique.

Ces résultats sont proches de ceux rapportés dans la littérature (**Boye & Alli 2000; De Wit & Swinkels 1980; Liu, et al. 1994**), où il a été démontré que la température de 70 °C est une température critique pour la dénaturation de β lg. Cette température de dénaturation varie

bien évidemment en fonction des conditions opératoires telles que le pH, la force ionique, la concentration protéique et la rampe de chauffage.

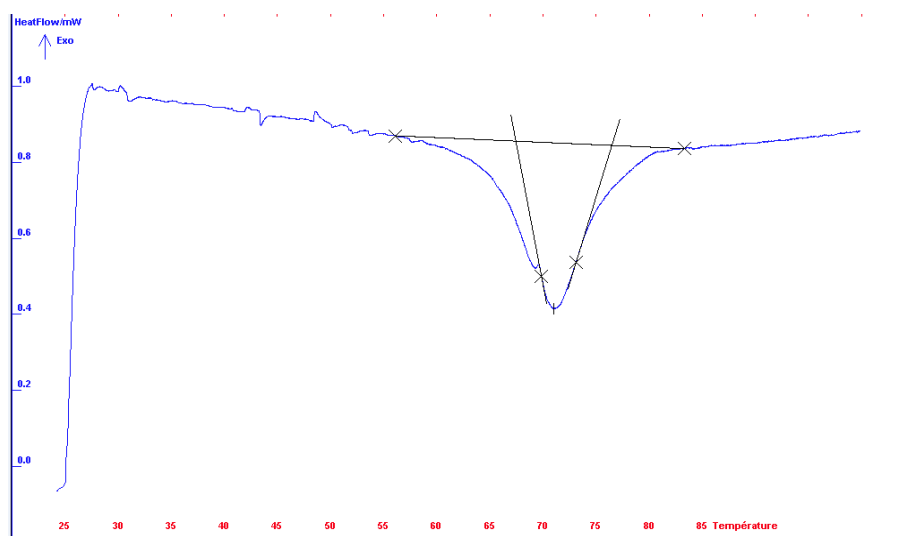


Figure.III.6a. Thermogramme de la fraction de β lg à 10% (m/m), à 5 mM NaCl, à pH 7,2 et une rampe de chauffage de 1°C/min.

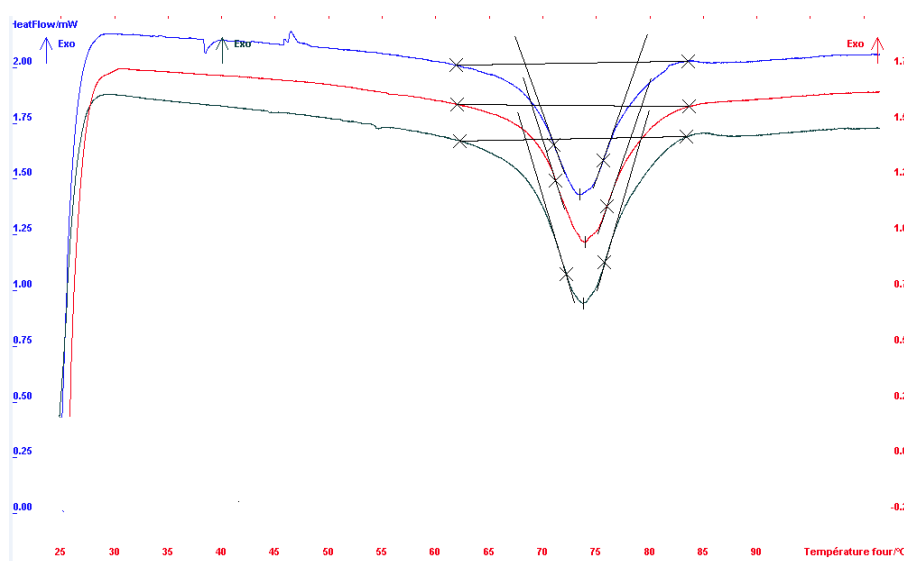


Figure.III.6b. Thermogrammes de la fraction de β lg à 10% (m/m) à 100 mM NaCl, à pH 7,2 et une rampe de chauffage de 1°C/min.

La valeur d'enthalpie ΔH_d résulte de la contribution des réactions exothermiques et endothermiques au cours la transition de l'état natif jusqu'à la denaturation de la protéine. Ces valeurs ΔH_d expérimentales pour la β lg sont conformes à celles obtenues par les auteurs précédents.

Dans notre étude, nous avons obtenu des valeurs de T_d et ΔH_d des globulines de pois (**tableau.III.7.**) nettement supérieures à celles des fractions de β lg; ces différences de thermostabilité sont liées au niveau de structuration de chaque type de protéine.

III.2.8. Détermination de la concentration minimale de gélification de β lg et Glob

Le traitement thermique d'une protéine conduit à sa dénaturation; il provoque des modifications profondes au niveau de sa structure, passant par le dépliement de la protéine jusqu'à l'exposition des groupements hydrophobes et les fonctions thiols. Cette dénaturation favorise l'agrégation des protéines. Sous l'effet de plusieurs paramètres tels que le pH, la présence ou l'absence de sel, la nature des sels, la concentration protéique et la vitesse de chauffage, la formation d'agrégats protéiques stables et d'un réseau tridimensionnel sont possibles. En général, une valeur faible de concentration minimale de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) d'une protéine confère à cette substance un meilleur pouvoir gélifiant

Les valeurs de $C_{g_{th}}$ des fractions obtenues des Glob et β lg sont présentées dans le **Tableau.III.13**. Dans des conditions opératoires de ce travail, les résultats de gélification thermique montrent que les valeurs de C_g des globulines étaient plus élevées que celles de β lg aux deux forces ioniques considérées.

Pour la fraction de Glob, nous avons observé une diminution de $C_{g_{th}}$ en fonction de l'augmentation de la force ionique ; les valeurs de $C_{g_{th}}$ variaient de 7 à 4,4% respectivement pour la Glob préparés à 5 et 100 mM NaCl. Par comparaison à la littérature, ces résultats étaient légèrement inférieurs à ceux indiqués pour les globulines obtenues par extraction saline (5,5% m/m) et très inférieurs pour un isolat commercial de pois (14,5% m/m) (**Sun & Arntfield 2010**). Cette différence de $C_{g_{th}}$ par rapport à nos résultats peut être due au mode d'extraction appliqué par ces auteurs, et à la composition de la fraction obtenue qui affecte sensiblement les propriétés fonctionnelles des globulines.

Concernant les fractions de β lg, celles-ci présentaient des valeurs de $C_{g_{th}}$ comprises entre 5 et 2,4% (m/m), respectivement pour des fractions préparés à 5 et 100 mM NaCl. Ces résultats sont légèrement inférieurs aux valeurs rapportées par **Renard, et Lefebvre (1992)**. En effet, ces auteurs ont obtenu une concentration minimale de gélification allant de 70 à 20 g/l respectivement pour une force ionique de 0 et 100 mM en NaCl à pH 7.

Tableau.III.13. Données de gélification de Glob et β lg, en fonction de la concentration protéique % (m/m), traités thermiquement à 85 °C pendant 60 min avec une rampe de chauffage de 1°C/min, avec ou sans sels ajoutés à pH 7,2.

% (m/m)	1	2	2,2	2,4	2,6	2,8	3	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	6	6,8	7	7,2
Echantillons																	
Glob 5mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-+	+	+
Glob 100mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-+	+	+	+	+	+	+	+	+
β lg 5mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-+	+	+	+	+	+
β lg 100mM	-	-	-	-+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(- : pas de gel ; -+ : solution très visqueuse ; + : gel)

La diminution de $C_{g_{th}}$ des protéines en fonction de l'augmentation de la force ionique correspond à l'effet des ions sur l'écrantage des charge répulsives, ce qui favorise les interactions protéines-protéines et l'agglomération de ce système en réseau de type gel.

III.3. Conclusion du chapitre

Pour notre étude des fractions de globulines de pois ont été obtenues par extraction à partir de la farine de pois délipidée avec rendement d'extraction d'environ 65%. Ces fractions sont riches en sous-unités de légumine ($\sim 28\%$) et de vicilines et convicine ($\sim 67\%$). Cependant l'utilisation de cette méthode d'extraction donnait un seuil d'hydrophobicité légèrement plus élevé par rapport à celui indiqué dans la littérature. La délipidation a permis d'avoir des fractions protéiques plus riches en protéines et plus pures (diminution de la lipoxigénase) avec des solutions protéiques limpides.

La concentration minimale de gélification thermique de Glob est améliorée par rapport à la littérature (7%, 4,4% à 5 et 100 mM NaCl respectivement). Le protocole adapté de la purification de la β -lactoglobuline, a permis d'obtenir des quantités suffisantes de protéines à partir de l'isolat de lactosérum, avec un rendement d'extraction de 55%.

La solubilité optimale des deux fractions globulaires a été obtenue pour une valeur de pH 7,2. Les thermogrammes obtenus par DSC ont confirmé que ces fractions n'étaient pas dénaturées par les traitements chimiques et physico-chimiques lors des phases d'extraction et donc utilisables pour la suite de notre étude.

Les résultats de caractérisation physicochimique de ces fractions natives en fonction de la force ionique (5 et 100 mM NaCl), ont montré des valeurs très proches à l'exception d'une légère augmentation de la solubilité et de la stabilité thermique à force ionique élevée.

Chapitre IV : Formation et caractérisation des agrégats solubles.

Ce Chapitre est constitué en partie de résultats ayant fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, et s'intéresse à la caractérisation des agrégats mixtes induits par thermodénaturation. Des données relatives au comportement de l'agrégation à une force ionique élevée (100 mM NaCl) ainsi que des données relatives au suivi des différentes caractéristiques physico-chimiques des agrégats de protéines pures ou en mélange (différents ratios β lg/Glob) en fonction de la concentration protéique et la force ionique complètent les données publiées. Dans ce chapitre, nous présenterons la préparation des agrégats seuls de β lg et de Glob, ensuite des agrégats mixtes thermiques obtenus à partir de mélanges dans des conditions différentes de concentrations protéiques (1 et 2% (m/m)) et de forces ioniques (5 et 100 mM NaCl). Nous avons choisi de travailler à des concentrations protéiques en dessous de la concentration minimale de gélification ($C_{g_{th}}$) pour les deux types protéines en nous basant sur les résultats obtenus dans le **Chapitre III. 2.8**.

IV.1. Détermination du taux d'agrégats solubles

L'agrégation des protéines globulaires résulte d'une manière générale d'un changement profond de la structure conduisant au dépliement protéique et à l'exposition des acides aminés enfouis dans le cœur de la protéine en surface. Un autre changement fondamental accompagne la dénaturation des protéines, il s'agit de l'exposition des fonctions thiols libres de la protéine. L'émergence de différentes interactions de types électrostatiques, physiques non spécifiques (hydrophobe, hydrogène...) et/ou chimiques spécifiques (échanges de ponts disulfures) mènera à la formation d'agrégats protéiques.

Les agrégats solubles induits par la chaleur sont obtenus après l'application d'un traitement thermique à une dispersion protéique dans un environnement faiblement minéralisé à pH neutre ou alcalin, où la forte précipitation de la matière protéique et la gélification ne sont pas présentes.

Le taux d'agrégats solubles de β lg et Glob ainsi que des différents mélanges de β lg/Glob en fonction de la concentration en protéine et de la force ionique est présenté dans la **Figure.IV.1**.

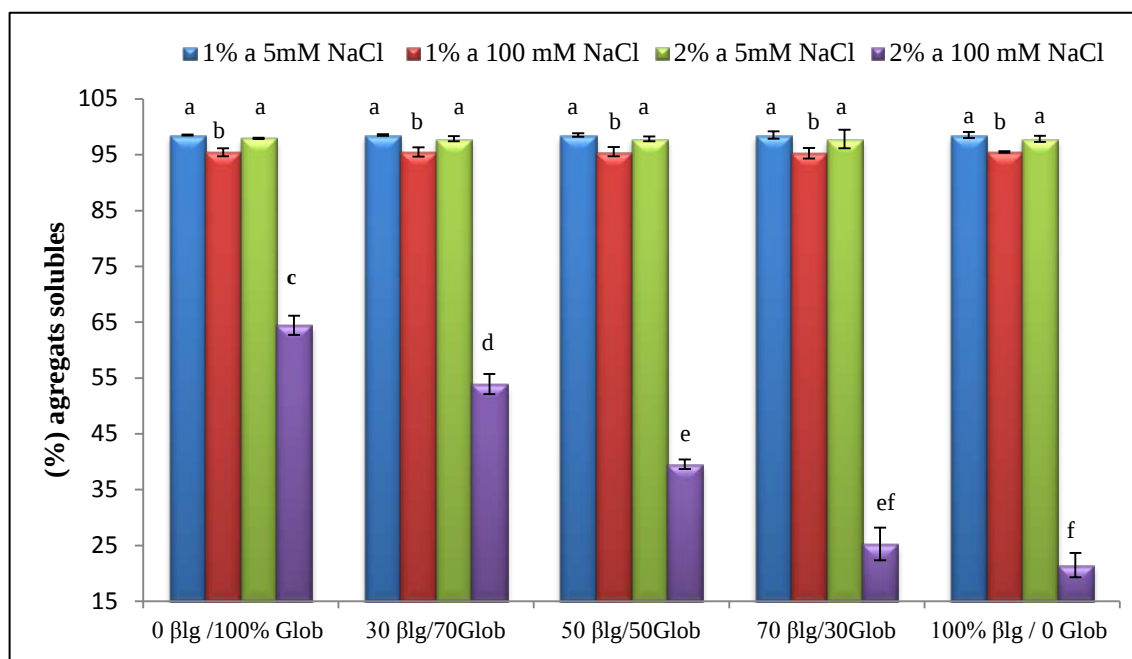


Figure.IV.1. Taux d'agrégats solubles dans les mélanges de β lg/Glob aux ratios massiques 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 et 100/0 à des concentrations 1 et 2% (m/m), à force ionique de 5 et 100 mM NaCl et à pH 7,2. Les valeurs portant la même lettre (a-f) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Dans les conditions de chauffage prolongé des solutions protéiques (1 heure à 85 °C), la conversion des protéines natives en agrégats solubles est très élevée (**Hoffmann & van Mil 1999; Schmitt, et al. 2007**). Nous avons donc considéré que les surnageants thermisés étaient constitués de protéines totalement dénaturées. Cette hypothèse sera confirmée ultérieurement par nos expériences.

Nous avons remarqué que la teneur en agrégats solubles était élevée et similaire pour toutes les solutions protéiques préparées à 1 et 2% avec une force ionique de 5 mM en NaCl. Le taux d'azote soluble avoisinait ~98% par rapport à la quantité introduite initialement (solution native).

La formation de ces agrégats a vraisemblablement été influencée par de fortes répulsions électrostatiques à 5 mM NaCl et loin du pI des deux protéines, ce qui empêche la sur-agrégation des protéines et la formation d'agrégats sédimentables. Les données de la littérature indiquent que dans un milieu de faible concentration en sel, les forces attractives (principalement van der Waals et hydrophobes) entre les protéines ne sont pas suffisamment fortes pour surmonter les forces de répulsion (principalement électrostatiques) et par

conséquent les protéines dénaturées ont tendance à exister soit comme des entités individuelles, soit sous forme de petits agrégats (**Bryant & McClements 1998**).

Dans cette étude nous avons utilisé une concentration protéique (1 et 2%) en dessous de la concentration critique de gélification, où il a été constaté que la formation d'agrégats insolubles est négligeable à faible force ionique. Des résultats proches ont été obtenus dans la littérature pour les protéines de lactosérum et de soja (**Hoffmann & van Mil 1999; Li, et al. 2007; Schmitt, et al. 2007**). Une légère diminution du taux d'agrégats solubles a été obtenue dans les dispersions protéiques (1%), chauffées à une force ionique de 100 mM, où le taux d'agrégats protéiques dans les surnageants était de ~ 95%.

Pour les suspensions protéiques à 2% préparées à 100 mM NaCl, la teneur en agrégats solubles obtenue était de ~63% pour Glob et ~22% pour β lg. De plus, cette teneur en agrégats solubles diminuait drastiquement lorsque la proportion de β lg augmente dans les mélanges (β lg/Glob). Le concentration était de ~54% pour le ratio 30 /70, ~37% pour le ratio de 50 /50 et ~24% pour le ratio de 70/30.

La perte de matière protéique dans les mélanges chauffés à une force ionique élevée peut être due à une dénaturation protéique suivie d'une agrégation et précipitation de cette dernière sous forme de culot. Dans ce cas, l'augmentation de la force ionique aurait favorisé l'agrégation des protéines seules ou dans les mélanges. Cela est dû à l'effet du sel conduisant à une diminution des répulsions électrostatiques par écrantage des charge par les contre-ions entre les particules, ce qui favorise les interactions protéine-protéine, et conduit par la suite à l'augmentation du taux d'agrégats insolubles (précipités). Des résultats similaires ont été obtenus dans la littérature pour des mélanges de lactosérum/protéines de soja à une force ionique de 100 mM NaCl (**Roesch & Corredig 2005**).

IV.2. Détermination de l'hydrophobicité de surface des agrégats solubles

L'hydrophobicité de surface (H_0) des solutions de β lg et de Glob natives et de leurs mélanges, ainsi que celle des agrégats solubles après dénaturation thermique a été mesurée en utilisant une sonde fluorescente extrinsèque 8-AnilinoNaphthalène-1-Sulfonate (ANS), à des concentrations protéiques de 1 et 2% et à force ionique de 5 et 100 mM NaCl. L'ANS se lie spécifiquement aux fragments hydrophobes accessibles et montre une bonne affinité pour les acides aminés aromatiques (**Hayakawa & Nakai 1985**). Ces résultats sont présentés dans les **Figure.IV.2.** et **Figure.IV.3.** Pour les mélanges préparés à une concentration protéique de

2%, les valeurs H_0 des Glob natives sont nettement supérieures à celles de la β lg native. Ceci est lié à la structure intrinsèque des protéines, à leur dépendance aux paramètres des solutions (pH, force ionique, température) ainsi qu'au procédé d'extraction (**Bryant & McClements 1998; Gueguen & Barbot 1988; Karaca, et al. 2011**).

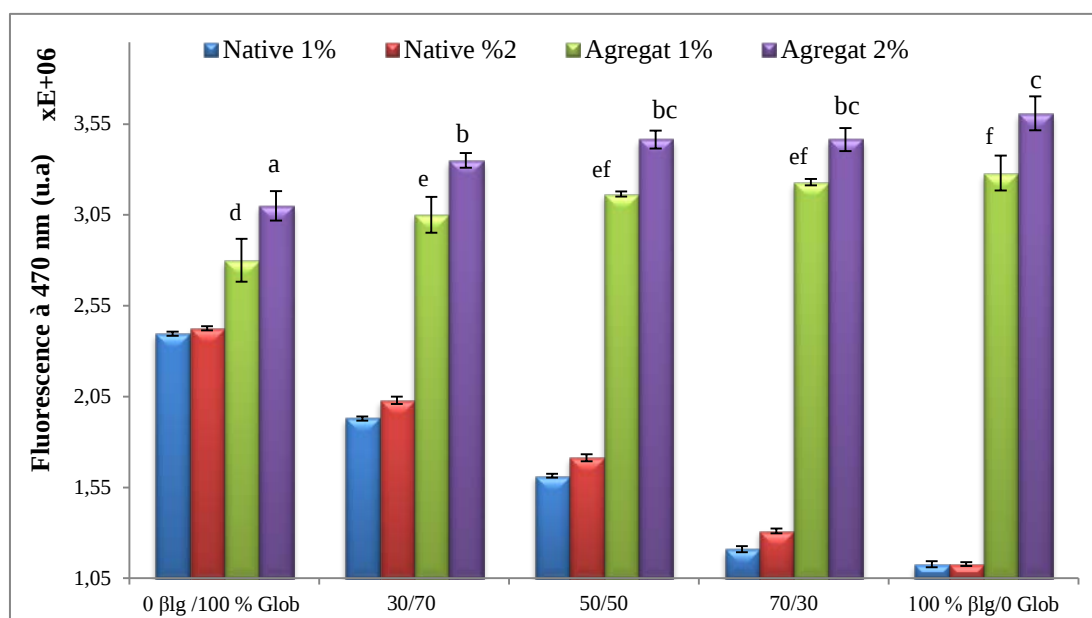


Figure.IV.2 Hydrophobicité de surface (H_0) des protéines natives et des agrégats solubles de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob (30/70, 50/50, 70/30) à une concentration de 1 et 2% et préparés à une force ionique de 5mM NaCl à pH 7,2. Les valeurs portant la même lettre (a-f) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Comme il a été évoqué précédemment concernant la production des fractions purifiées de Glob, nous avons procédé à une extraction alcaline suivie par une précipitation acide ; il semblerait que ce processus de préparation et d'extraction des Glob ait généré l'exposition des groupements hydrophobes enfouis au cœur des protéines vers la surface. D'après la littérature, la sous-unité protéique $L\beta$ du monomère de légumine ($L\alpha\beta$) est un polypeptide hydrophobe qui est situé dans le noyau de la structure hexamérique de la légumine, tandis que $L\alpha$ plutôt hydrophile est orienté vers la surface (**Gueguen 1989; Marcone, et al. 1998b**).

Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature (**Karaca, et al. 2011; Papalamprou, et al. 2009**). Ces auteurs ont attribué un taux élevé d'hydrophobicité à la teneur élevée en légumine dans l'isolat de Glob, ce qui était le cas dans notre étude (~28% de légumine obtenue d'après l'analyse densitométrique, **Chapitre III.1.3**). Les valeurs de H_0 des agrégats formés étaient supérieures à celles des protéines seules à l'état natif. Cela se

traduit par l'exposition des groupes hydrophobes à la surface des protéines, après leur déplissement sous l'effet de la thermodénaturation. Nous avons notamment remarqué que la valeur d'hydrophobicité des agrégats de β lg était $\sim 3,5$ fois plus importante que celle des protéines natives. Ce résultat est proche de celui mentionné dans la littérature (**Zhu & Damodaran 1994**).

La formation des agrégats protéiques lors du traitement thermique des protéines résulte donc d'interactions intermoléculaires complexes. Les interactions hydrophobes sont considérées comme les interactions principales mises en jeu dans les agrégats (**Nakai 1983**). Dans les mêmes conditions de chauffage et de solvant utilisées, l'hydrophobicité de surface des agrégats de β lg était $\sim 1,2$ fois plus élevée que celle de Glob de pois. Cette différence est due à la différence de composition en acides aminés entre les deux protéines et également à la sensibilité des protéines lors de la dénaturation thermique (**Voutsinas, et al. 1983**).

L'augmentation de l'hydrophobicité était significative pour l'ensemble des ratios massiques β lg/Glob. Les valeurs de H_0 après traitement thermique indiquent une augmentation significative des interactions hydrophobes avec l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges.

Concernant les mélanges préparés à une concentration protéique de 1%, les valeurs de H_0 étaient inférieures à celle obtenue pour les agrégats formés à une concentration de 2%. Cela indique que l'augmentation de la concentration protéique dans le système chauffé conduit à l'augmentation de l'exposition des groupes hydrophobes des protéines. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature, qui montrent l'effet de la concentration protéique sur l'hydrophobicité d'agrégats de globulines de soja dans des conditions opératoires proches des nôtres (**Guo, et al. 2015; Wagner, et al. 2000**).

La **Figure.IV.3.** présente l'évolution de l'hydrophobicité de surface des différents échantillons natifs et après agrégation préparés à une concentration de 1 et 2%, à une force ionique de 100 mM NaCl et à pH 7,2. Dans ces conditions, les résultats montrent que les valeurs de H_0 obtenues étaient plus élevées que celles obtenues pour les agrégats préparés à 5 mM NaCl. L'augmentation relative de H_0 est estimée de 1,25 à 1,40 fois plus élevée respectivement pour les agrégats de Glob et β lg (préparés à 2%) par rapport à celle obtenues à 5 mM NaCl. Cela signifie que l'augmentation de la force ionique conduit à l'augmentation de l'hydrophobicité de surface. Des résultats similaires ont été observés pour les mélanges à

différents ratios massiques β lg/Glob, où il a été observé aussi que l'hydrophobicité des agrégats augmente significativement avec la proportion de β lg.

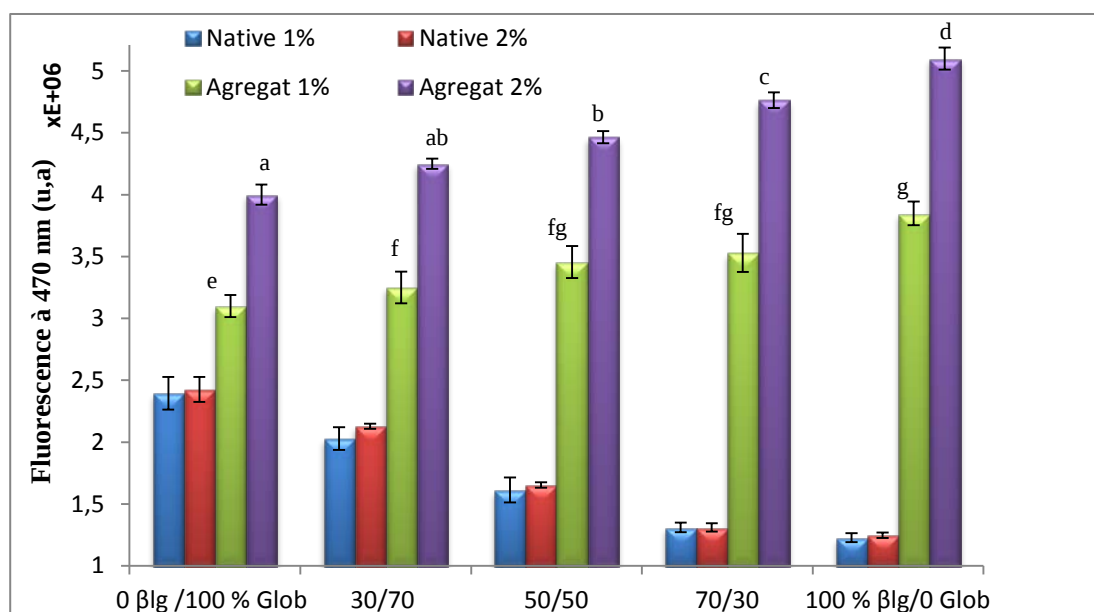


Figure.IV.3. Hydrophobicité de surface (H_0) des protéines natives et des agrégats solubles de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob (30/70, 50/50, 70/30) à une concentration de 1 et 2% et préparés à une force ionique de 100 mM NaCl à pH 7,2. Les valeurs portant la même lettre (a-g) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

L'augmentation de l'hydrophobicité dans ces conditions (pH neutre, 100 mM NaCl), est due à l'effet de la diminution des répulsions électrostatiques entre les molécules, favorisant d'avantage l'exposition des groupements hydrophobes des protéines. Ces résultats sont cohérents avec ceux mentionnés dans la littérature (**Baussay, et al. 2004; Hoffmann & van Mil 1997; Mori, et al. 1982; Ryan, et al. 2012; Schmitt, et al. 2007**). Néanmoins, **Shmitt, et al. (2007)** ont suggéré que la diminution de l'hydrophobicité de surface, est associée à la forme sphérique des agrégats formés au-dessous d'un pH neutre, ce qui conduit au masquage des sites hydrophobes. A pH 7, l'augmentation de H_0 serait liée à la forme fibrillaire des agrégats.

En résumé, les résultats précédents ont démontré que la force ionique, la nature ainsi que la concentration protéique influencent l'hydrophobicité de surface des particules et donc la formation d'agrégats solubles issus de protéines seules ou en mélange. Cependant, ces effets sont nettement plus marqués sur les agrégats solubles formés à 100 mM NaCl (Cf **Chapitre IV.1**). On peut donc émettre l'hypothèse que les interactions hydrophobes sont

responsables de la formation de macroagrégats à une force ionique élevée induisant la sédimentation d'une partie de la matière protéique.

IV.3. Quantification des liaisons covalentes formées dans les agrégats

Afin de mettre en évidence l'implication des ponts disulfures dans la formation des agrégats de Glob et/ou de β lg, la quantification des groupements sulfhydriles libres et totaux a été déterminée par la méthode d'Ellman. Le **Tableau.IV.1.** présente les teneurs en groupement thiols libres, et en groupements SS dans les agrégats de β lg, agrégats de Glob et des agrégats mixtes formés à partir d'une solution protéique à 2% à différentes forces ioniques (5 et 100 mM NaCl).

Tableau IV.1. Quantification des groupes sulfhydriles (S^-) et des ponts disulfures (SS) dans les échantillons de β lg et Glob natifs, et les agrégats solubles des mélanges β lg/Glob à différents ratios massiques chauffés à 85 °C pendant 60 min. Tous les échantillons ont été préparés à une concentration massique de 2% en protéines à 5 ou 100 mM NaCl et à pH 7,2.

Echantillons		Teneur en ^A S^- libre ($\mu\text{mol/g}_{\text{protein}}$)	Teneur en ^B SS ($\mu\text{mol/g}_{\text{protein}}$)
Natifs	Glob	$2,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$
	30/70	nd	nd
	50/50	nd	nd
	70/30	nd	nd
	β lg	$42,5 \pm 0,2$	$102,5 \pm 0,3$
Agrégats à 5 mM NaCl	Glob	$7,1 \pm 0,2$ a	$1,8 \pm 0,3$ a
	30/70	$10,7 \pm 0,3$ ab	$35,8 \pm 0,1$ b
	50/50	$12 \pm 0,4$ b	$59 \pm 0,3$ c
	70/30	$14 \pm 0,2$ bc	$89 \pm 0,1$ d
	β lg	$17,2 \pm 0,3$ c	$114,1 \pm 0,1$ e
Agrégats à 100 mM NaCl	Glob	$7,2 \pm 0,3$ a	$1,6 \pm 0,1$ a
	30/70	$7,4 \pm 0,4$ a	$24,2 \pm 0,2$ b
	50/50	$8,1 \pm 0,1$ b	$43,1 \pm 0,1$ c
	70/30	$9,4 \pm 0,3$ bc	$63,2 \pm 0,5$ d
	β lg	$12,2 \pm 0,1$ c	$91,2 \pm 0,5$ e

Pour les solutions de β lg chauffées à 5 mM NaCl, l'agrégation des protéines conduit à une diminution de taux de S^- libre ($42\text{-}17 \mu\text{mol } S^-/\text{g}_{\text{protéines}}$) ; en conséquent une augmentation de la valeur SS a été remarquée ($102\text{-}114 \mu\text{mol SS}/\text{g}_{\text{protéines}}$). Ce résultat est en accord avec les travaux rapportés par **Funtenerberger, et al. (1995)**.

Les groupes thiols contenus dans la protéine de lait native sont enfouis dans la structure de la molécule. L'application d'une dénaturation thermique rendra ces groupes accessibles. L'oxydation des thiols libres et les réactions d'échange S^-/SS induisent la formation de ponts disulfure entre les protéines et conduisent à l'agrégation de ces protéines (**Liu, Relkin et al. 1994; Hoffmann and van Mil 1997; Bryant and McClements 1998; Schokker, Singh et al. 1999**).

Une plus faible teneur en groupes S^- libres a été enregistrée ($\sim 17 \mu\text{mol } S^- / \text{g}_{\text{protéine}}$) par rapport à celle obtenues par **Liu, et al. (1994)** ($\sim 28 \mu\text{mol } S^- / \text{g}_{\text{protéine}}$) pour des agrégats de βlg chauffés à 85°C pendant 15 min. Cela peut s'expliquer par l'effet de la concentration protéique et le temps de chauffage prolongé (60 min à 85°C) utilisé dans notre étude, qui favoriserait l'oxydation des thiols libres et les échanges S^-/SS , réduisant par conséquent le taux de S^- libres.

En ce qui concerne la Glob, il a été mentionné que la légumine ($L\alpha\beta$) est la source principale d'acides aminés soufrés, avec éventuellement la convicine qui peut contenir un ou deux résidus de cystéine par unité, tandis que la viciline est totalement dépourvue de ces groupements (**Croy, Gatehouse et al. 1980; O'Kane, Vereijken et al. 2005**). Dans notre cas, la teneur mesurée en groupes S^- libres de Glob à l'état natif et dénaturé était légèrement inférieure à celle reportée par **Mession, et al. (2015)**. L'agrégation thermique pour Glob conduit à une diminution (~ 2 fois) de la valeur de SS mesurée, alors que le contenu en S^- augmente. Les auteurs cités ci-dessus, ont observé que la dénaturation thermique de la fraction enrichie en légumine, conduit à l'augmentation de la teneur en S^- qui proviendrait de la présence de ponts disulfures préexistant dans la structure avant chauffage. Par ailleurs, **Mori, et al. (1982)** ont montré que la dénaturation thermique des fractions 11S de soja à une faible concentration protéique (0,5%, m/m) conduit à l'agrégation de ces protéines par des interactions hydrophobes. Cette association va générer une augmentation du taux de S^- libre en surface dans la dispersion d'agrégats de globulines de soja. Nous avons observé un comportement similaire des Glob dans notre système d'étude.

On notera que pour les mélanges ($\beta\text{lg}/\text{Glob}$) préparés à une force ionique de 5 mM, l'augmentation de la proportion de βlg conduit à une augmentation de la teneur en SS , et que la teneur en S^- libre diminue proportionnellement avec celle-ci. L'augmentation de la teneur en SS dans les agrégats issus de mélanges ($\beta\text{lg}/\text{Glob}$) pourrait impliquer des échanges de

ponts disulfures entre molécules de β lg et sous-unités de légumine (voire de convicine), pendant leur dissociation et leur réassociation.

Pour les mélanges préparés à une force ionique de 100 mM, les résultats montrent que les valeurs de S^- et SS étaient inférieures à celles mesurées dans les mélanges protéiques à faible force ionique. Ce résultat est concordant avec les travaux rapportés dans la littérature, et particulièrement pour les agrégats de β lg, où les auteurs confirment que dans des conditions expérimentales proches des nôtres (pH 7 et faible force ionique), les agrégats de β lg formés font intervenir principalement des liaisons disulfures intermoléculaires (**Hoffmann & van Mil 1999**) avec l'implication plus faible de liaisons non covalentes.

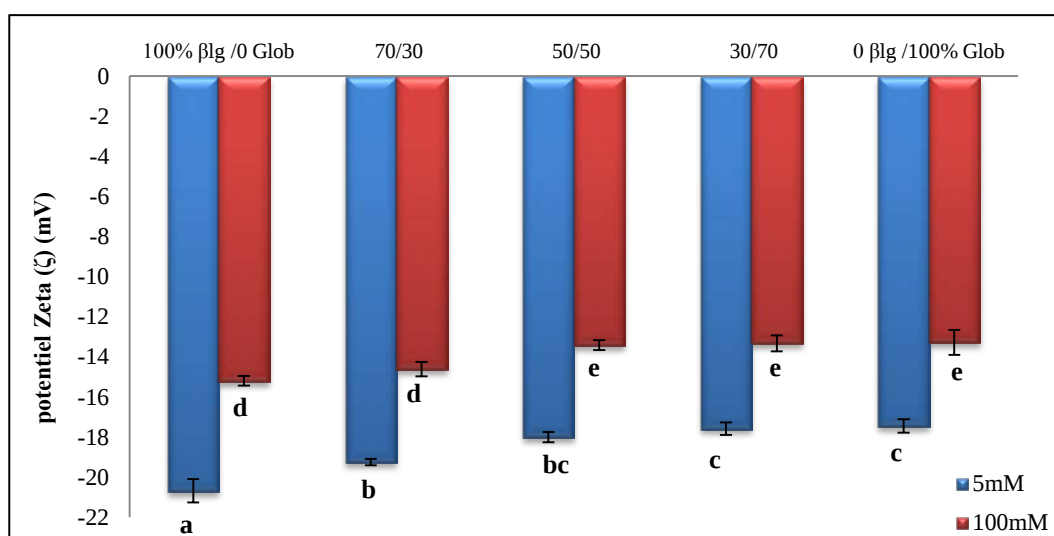
Il est connu dans la littérature que la dénaturation thermique induit des échanges covalents via des ponts disulfures qui sont responsables de la formation d'agrégats solubles de β lg purs ((**Hoffmann & van Mil 1997**; **Mounsey & O'Kennedy 2007**) et dans la stabilisation des agrégats de Glob purs (**Mession, et al 2013; 2015**). Par contre, dans le cas de mélanges des deux protéines, la méthode globale de dosage des S^- et SS ne permet pas de démontrer que les échanges de ponts disulfures sont impliqués entre les 2 types de protéine lors de la formation d'agrégats thermiques mixtes.

IV.4. Détermination de la charge de surface des agrégats solubles

Comme discuté précédemment (Cf **Chapitre III.1.6** et **III.2.6**), les particules colloïdales portent une charge à leur surface ; celle-ci peut être exprimée sous la forme d'un potentiel de surface. Il a été mentionné dans la littérature que la charge de surface des particules de protéine, est due à l'ionisation partielle des divers résidus d'acides aminés (**Malhotra & Coupland 2004**). Afin de déterminer les forces répulsives existantes dans les solutions protéiques étudiées, des mesures de la charge de surface des différents mélanges ont été effectués par Zétamétrie. Les valeurs de la charge de surface des différents échantillons étudiés à des concentrations protéiques de 2 et 1% sont présentées respectivement sur la **Figure.IV.4.** et la **Figure.IV.5.**

Les résultats montrent que le potentiel Zeta (ζ) des différents échantillons traités thermiquement présente des valeurs négatives plus élevée en valeur absolue que celles mesurées pour les protéines natives (Cf **Chapitre III.1.6** et **III.2.6**). Les valeurs de potentiel Zeta (ζ) pour la β lg native, préparée respectivement à 5 et 100 mM NaCl étaient ~ -17 (mV) et ~ -10 (mV). Après chauffage des échantillons, une augmentation nette de la charge de surface a

été constatée à ~ -20 (mV) et ~ -15 (mV) respectivement pour les mêmes solutions et forces ioniques (5 et 100 mM NaCl). Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **Ryan, et al. (2012)** pour la β lg.



La **Figure.IV.4.** Potentiel Zeta (ζ) des agrégats de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/ Glob, formés à 5 et 100 mM NaCl et à une concentration protéique 2% (m/m) et à pH 7,2. Les valeurs portant la même lettre (a-e) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Dans le cas des solutions de Glob natives, nous avons enregistré des valeurs de potentiel Zeta (ζ) de ~ -17 (mV) pour l'échantillon préparé à 5 mM NaCl, et de ~ -10 (mV) pour l'échantillon préparé à 100 mM NaCl. Après chauffage de la Glob, on observe que le potentiel de surface diminue à ~ -18 (mV) et ~ -13 (mV) pour les agrégats préparés respectivement à 5 et 100 mM NaCl. Ces valeurs sont légèrement inférieures en valeur absolue à celle rapportées dans les travaux de **Stone, et al. (2015)**. Ceci peut être dû aux conditions de préparation de l'échantillon (**Salgın, et al. 2012**).

Concernant les agrégats seuls et les mélanges à différents ratios, l'augmentation de potentiel Zeta (ζ) (valeurs absolues) après thermodénaturation des protéines (seules ou en mélanges) semble indiquer que la structure de la protéine est affectée conduisant à l'exposition en surface des résidus d'acides aminés ionisés et donc à l'augmentation des charges négatives dans les mélanges (**Ryan, et al. 2012; Schmitt, et al. 2007**).

L'obtention d'une valeur plus faible du potentiel Zeta (ζ) pour les agrégats préparés à une force ionique de 100 mM NaCl, indique d'une part l'écrantage des charges de surface de

ces agrégats par le sel et d'autre part une diminution du contact entre les protéines et le solvant, dû à l'augmentation des interactions protéine-protéine et de l'agrégation de ces protéines.

En ce qui concerne les agrégats préparés à différents ratios β lg/Glob, nous avons remarqué que la β lg semble contrôler la charge de surface des mélanges. Les variations observées de potentiel Zeta (ζ) semblent proportionnelles à la quantité de β lg introduite dans le mélange. La diminution de l'apport de β lg dans les mélanges entraîne la diminution du potentiel Zeta (ζ) en valeur absolue. Les agrégats solubles préparés à 100 mM NaCl présentent des valeurs de potentiel Zeta (ζ) inférieur au seuil de -16mV (en valeur absolue). Cela s'est traduit par la forte précipitation des protéines à 100 mM NaCl et plus particulièrement dans le cas de la β lg seule.

Riddick, (1968) a défini la stabilité des dispersions protéiques dénaturées en fonction des valeurs du potentiel Zeta: **(i)** de 0 à ± 3 mV: agrégation et précipitation maximale; **(ii)** +5 à -5 mV forte agrégation et précipitation; **(iii)** de -10 à -15 mV seuil d'agrégation; **(iv)** de -16 à -30 mV seuil de dispersion des particules; **(v)** de -40 mV à -31 stabilité modérée; **(vi)** à -60 mV -41 stabilité assez bonne; **(vii)** à -80 mV -61 très bonne stabilité et **(viii)** de -81 à -100 mV excellente stabilité.

En nous basant sur la définition de **Riddick, (1968)**, on peut qualifier les différents agrégats obtenus à 5 mM NaCl comme des agrégats sous forme de dispersion particulaires (ζ entre -16 à -30 mV), tandis que les agrégats formés à 100 mM NaCl, peuvent être considérés comme au seuil de forte agrégation. Ce classement est en accord avec les résultats obtenus précédemment concernant le taux d'agrégats solubles (cf. **Chapitre IV.1**). La **Figure.IV.5** montre les valeurs de la charge de surface des différents échantillons étudiés à une concentration protéique de 1%. Nous avons observé que la charge de surface des échantillons était plus élevée que celle mesurée dans les mélanges à une concentration de 2% (notamment pour les agrégats de β lg).

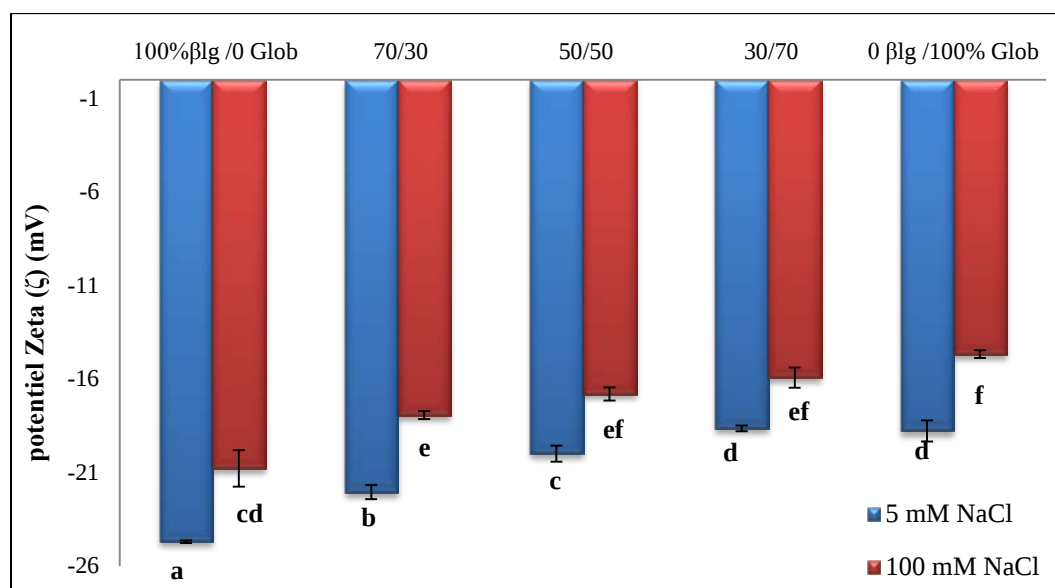


Figure.IV.5. Potentiel Zeta (ζ) des agrégats de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/ Glob, formés à 5 et 100 mM NaCl et à une concentration protéique 1% (m/m) et à pH 7,2. Les valeurs portant la même lettre (a-g) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Les résultats montrent que les agrégats seuls et les mélanges (β lg/Glob) formés à 5 mM NaCl sont en état de dispersion de particules (potentiel Zeta (ζ) compris entre -16 à -30 mV). Tandis que les agrégats de Glob formés à 100 mM NaCl se situent au seuil d'agrégation ; cependant le taux élevé de ces agrégats de Glob dans le surnageant (plus de 95%) indique la formation de macroagrégats qui restent non sédimentables du fait de la faible concentration totale de la solution.

Les résultats montrent également l'augmentation du potentiel Zeta (ζ) (valeur absolue) des agrégats en fonction de l'augmentation de l'apport de β lg dans les mélanges (β lg/Glob). Ceci consolide également notre hypothèse du rôle de la β lg sur l'inhibition de la formation de macroagrégats de Glob en mélange.

IV.5. Caractérisation des interactions intermoléculaires par SDS-PAGE

Au cours de notre étude, l'électrophorèse SDS-PAGE a été utilisée comme méthode de choix pour approfondir la connaissance des interactions mises en jeu dans la formation des agrégats de protéines seules et de ceux issus de mélanges protéiques à différents ratios massiques.

IV.5.1. Profils SDS-PAGE des agrégats soluble à une concentration de 2%

IV.5.1.1 Profils SDS-PAGE des agrégats solubles préparés à 5 mM

La composition polypeptidique des agrégats solubles de β lg, de Glob et des différents mélanges protéiques à différents ratios massiques β lg/Glob à 30/70, 50/50, 70/30, préparés à une force ionique de 5 mM NaCl et à une concentration protéique de 2% (m/m) est présentée sur la **Figure.IV.6**.

Dans cette partie, nous allons discuter la variation d'intensité des bandes des différentes fractions protéiques de chaque échantillon en considérant que l'intensité de bandes obtenue dans les conditions réductrices égale 100% sachant que les concentrations protéiques des échantillons déposées dans les puits sont équivalent, comme il a été expliqué au **Chapitre II.3.4**.

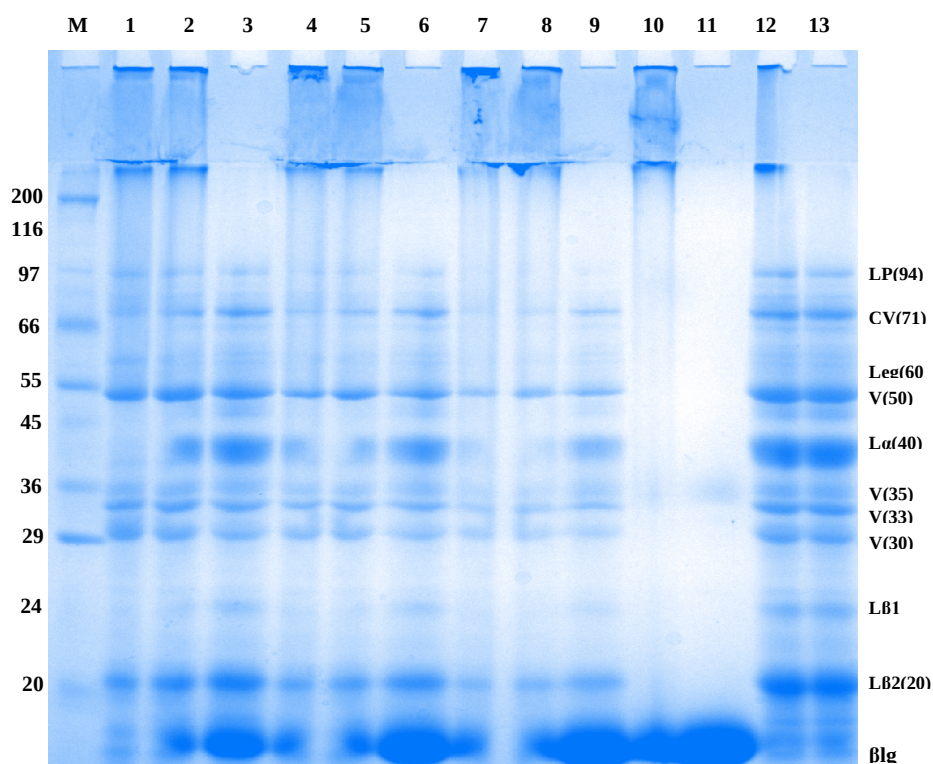


Figure.IV.6. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Natives (tampon + échantillon), Réductrices (SDS+DTT) et Non Réductrices (SDS) des agrégats solubles de β lg, Glob et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob, à une force ionique de 5 mM NaCl. Puits 1, 2, 3 ratio 30/70 en C N ,CNR,CR; Puits 4, 5, 6 ratio 50/50 en CN,CNR,CR; Puits, 7, 8, 9 ratio 70/30 en CN,CNR,CR,; Puits 10, 11 agrégats β lg en CNR,CR; Puits 12, 13 agrégats Glob en CNR, CR; M : Marqueurs de masse molaire (kDa); $L\alpha$: polypeptide acide de la légumine; $L\beta_{1,2}$: polypeptides basiques de la légumine ; V : vicilines; CV: convicine; LP: lipoxgénase, β lg : β -lactoglobuline; Glob: globuline.

Les résultats montrent la présence d'agrégats de masses moléculaires importantes (supérieures à 200 kDa) en conditions natives (échantillons + tampon sans SDS et DTT) pour les puits n°1, 4, 7, et en conditions non réductrices pour les puits n° 2, 5, 8, 10, 12 (échantillons + SDS). L'absence de ces agrégats est constatée en conditions réductrices (échantillons + SDS + DTT, puits n° 3, 6, 9, 11, 13). Ceci indique que les protéines ont été polymérisées sous la forme d'agrégats solubles de masses moléculaires élevées lors du traitement thermique.

L'analyse densimétrique du profil électrophorétique pour les agrégats de Glob montre un dépôt d'agrégats de hauts poids moléculaires supérieurs à 200 kDa dans le gel de séparation et de concentration dans le puits n°12. Les sous-unités $L\alpha$ (40 kDa), $L\beta_1$ (24 kDa), $L\beta_2$ (20 kDa) sont partiellement affectées par la dénaturation et/ou l'agrégation. En effet, l'intensité relative de ces bandes augmente légèrement à raison de ~11, 10, 11% respectivement pour les sous-unités $L\alpha$, $L\beta_1$, $L\beta_2$ dans les conditions réductrices (puits n°13) par comparaison à celle mesurée dans des conditions non réductrices (puits n°12). Cela signifie que les légumine 11S participaient à hauteur de ~10% à l'agrégation des Glob via des ponts disulfures en formant des agrégats de hauts poids moléculaires.

Cette observation sur le greffage covalent entre les sous-unités de légumine de pois a été constatée dans la littérature (**Gatehouse, et al. 1980; Gueguen & Barbot 1988; Matta, et al. 1981; Messian, et al. 2015a; O'Kane, et al. 2004a**). Comme ~90% de $L(\alpha,\beta)$ ont migré dans le puits n°12, ces sous-unités formeraient des agrégats via des liaisons non covalentes. Des résultats similaires ont été reportés par (**Mori, et al. 1982**) concernant la formation d'agrégats 11S de soja via des interactions essentiellement hydrophobes à une concentration protéique de 0,5%. A une concentration protéique de 5%, la formation d'agrégats solubles 11S était également gouvernée par une réassociation des sous-unités acides et basiques par des liaisons covalentes.

L'analyse des puits 12 et 13 montre que les profils de migration des polypeptides 7S (vicilines, conviciline) étaient identiques entre les conditions réductrices et non réductrices. L'analyse densimétrique de ces bandes ne révèle pas d'évolution quantitative de ces sous-unités. Il a été démontré en effet que les vicilines sont dépourvues de groupements sulfhydryles et de ponts disulfures et que l'agrégation thermique des sous-unités de viciline se réalisent qu'après une dissociation des trimères par des interactions non covalentes (**O'Kane,**

et al. 2004a). (Gatehouse, et al. 1981; Gueguen, et al. 1988; Mession, et al. 2013; O'Kane, et al. 2004a).

Les profils de migration des polypeptides issus d'agrégats de β lg formés à une concentration de 2% (m/m) sont présentés dans les puits 10 et 11 en conditions non réductrices et réductrices respectivement. L'analyse densimétrique des échantillons préparés dans les conditions non réductrices (+ SDS) montre la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires ($>> 200$ kDa) de β lg piégés dans le gel de concentration: (i) $\sim 30\%$ par des interactions hydrophobes, (ii) et $\sim 70\%$ via des réactions S $\cdot$ /SS. Ce résultat est en accord avec des travaux déjà publiés sur l'agrégation de β lg à pH 7, qui implique principalement des liaisons disulfures intermoléculaires (Hoffmann & van Mil 1997).

L'analyse des profils de migration correspondant à l'échantillon issu du mélange 30/70 montre la présence d'une bande de légumine (60 kDa) dans le puits n°1 (sans SDS et DTT) représentant $\sim 5\%$ du total des légumine engagées. Cette bande minoritaire de légumine n'est plus visible dans le puits n°2 en présence de SDS. Cette sous-unité $L\alpha\beta$ est donc maintenue par une liaison non covalente. Cette fraction de légumine ($\sim 5\%$) ne participe donc pas dans les interactions protéine-protéine, et reste en coexistence avec les agrégats solubles formés comme suggéré par (Mession, et al. 2013). Il a été montré par ailleurs qu'après une dénaturation thermique des légumine de haricot, une réassociation des sous-unité ($L\alpha,\beta$) s'opère afin de former des agrégats via des liaisons non covalentes, sans passer par des échanges de liaisons SS (Zheng, et al. 1993). Pour les autres mélanges (puits n° 4 et 7 respectivement) en conditions natives, on remarque l'absence de cette fraction minoritaire de légumine. Cela pourrait signifier que cette fraction s'est associée à d'autres fractions de légumine et/ou de β lg en formant des agrégats de hauts poids moléculaires en fonction de l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges.

La présence de toutes les sous-unités de vicilines est observée dans le puits n°1 avec une intensité plus faible $\sim 35\%$ par rapport aux mêmes polypeptides dans le puits n°2 (mélange β lg/Glob de 30/70). Ces fractions de viciline ne participent pas à la formation des agrégats dans ces conditions de faible concentration protéique (2%, m/m) et dans un milieu de faible force ionique. Ce comportement a été signalé dans les travaux de (Li, et al. 2007). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les mélanges 50/50, 70/30 (puits 4, 7), avec une diminution de l'intensité des fractions de vicilines de ~ 22 à 13% respectivement dans les

puits (puits 6, 9). Cette diminution est proportionnelle à la diminution de la proportion de Glob dans les mélanges.

Au travers de l'analyse du profil électrophorétique des mélanges, il semble que le comportement de β lg n'a pas été changé, c'est à dire que la majorité des protéines s'agrègent par des liaisons covalentes (apparition de la totalité de β lg dans les conditions réductrices) et une minorité par des liaisons non covalentes (présence d'une faible bande dans les conditions non réductrices), comme il a été expliqué précédemment.

Pour les mélanges, on note une apparition des bandes $L\alpha$, $L\beta_{1,2}$ de faible intensité dans les conditions non réductrices (puits 2, 5, 8) à raison de ~32, 15, 4% pour $L\alpha$, et 15, 13 et 6% pour $L\beta_{1,2}$ respectivement pour les ratios massiques 30/70, 50/50, 70/30. Ces fractions tendent à s'intensifier dans les conditions réductrices (puits 3, 6, 9). Ainsi, le taux d'agrégats ($M_w > 200$ kDa) observés sur la surface des gels de concentration et séparation et formés par des interactions covalentes serait de ~33, 37 et 55% respectivement dans les mélanges β lg/Glob aux ratios massiques 30/70, 50/50 et 70/30.

Concernant la fraction attribuée à la convicine (~71 KDa), l'analyse du gel SDS-PAGE montre que la bande de ce polypeptide présente une faible intensité dans les puits 2, 5, 8 (+SDS) et augmente clairement avec l'ajout de SDS+DTT ; la bande est d'autant plus intense que la proportion de Glob augmente dans le mélange (puits n° 3, 4, 9). Par contre, dans le puits n° 12 et 13 pour l'échantillon de Glob seule, l'analyse densimétrique ne montre pas un changement d'intensité de la convicine. En se basant sur cette observation, il semblerait donc que la convicine interagisse via des interactions hydrophobes, et des échanges de ponts disulfures dans les mélanges d'agrégats protéiques. Dans la littérature, il a été mentionné que cette fraction contient effectivement un résidu de cystéine et un résidu de méthionine par sous-unité protéique contrairement à la viciline qui n'a pas d'acides aminés soufrés (Croy, et al. 1980; O'Kane, et al. 2004a).

L'augmentation de l'intensité des fractions $L\alpha$, $L\beta_1$ et $L\beta_2$ et de convicine dans les conditions réductrices pour les mélanges est un indice de l'implication et de la participation de β lg dans la formation d'agrégats via des interactions covalentes avec ces fractions. D'après ces résultats, il semblerait que des échanges entre la β lg et les différents sous-unités de Glob via des liaisons covalentes et/ou des interactions non covalentes s'opèrent dans le milieu au cours de la thermodénaturation simultanée des protéines.

Ces résultats sont en accord avec les hypothèses précédentes émises à partir des dosages S⁻/SS confirmant l'implication de liaisons covalentes entre sous-unités de β lg et/ou des sous-unités de légumine au cours de la thermodénaturation (Cf. **Chapitre IV.3**).

A la même force ionique (de 5 mM NaCl), nous avons étudié le profil électrophorétique des agrégats de β lg, Glob et les mélange de différents ratios massique (β lg/Glob) préparés à une concentration protéique de 1%. Les résultats montrent que le taux d'interactions intermoléculaires entre les protéines est très faible, accompagné d'un faible dépôt d'agrégats (supérieurs à 200 kDa) sur la surface de gel de séparation et de concentration (résultats non montrés).

IV.5.1.2 Profils SDS-PAGE des agrégats solubles préparés à 100 mM NaCl

La composition polypeptidique des agrégats solubles de β lg, de Glob et les différents mélanges protéiques à différents ratios massiques β lg/Glob de 30/70, 50/50, 70/30, préparés à une force ionique de 100 mM NaCl et à une concentration protéique initiale de 2% (m/m) sont présentés dans la **Figure.IV.7**.

Le profil électrophorétique des agrégats préparés à 100 mM NaCl montre une similarité avec celui des agrégats préparés à 5mM NaCl, avec des intensités de bandes différentes quelque soit la solution protéique étudiée.

Concernant les agrégats de Glob obtenus à 100 mM NaCl (puits 11, 12), le comportement d'agrégation n'a pas changé par rapport aux agrégats de Glob formés à une force ionique de 5mM NaCl (**Figure.IV.6**).

Cependant, il a été observé une diminution de la formation des agrégats via des interactions covalentes (~5% contre 10% à 5 mM NaCl). L'analyse densimétrique montre que ~95% de L(α , β) ont migré dans le puits n°11 sous l'effet de SDS ; ces sous-unités formeraient donc des agrégats via des interactions hydrophobes à une faible concentration protéique. Des résultats similaires ont été reportés dans la littérature (**Mori, et al. 1982**).

L'intensité relative de la bande de β lg (puits 9,10), indique que cette dernière forme des agrégats (à une force ionique de 100 mM NaCl) principalement par des liaisons non covalentes (l'ajout de SDS rompt ces interactions). L'implication de liaisons covalentes est estimé dans ce cas à ~30% ce qui est plus faible que dans la condition 5 mM précédente (~70%).

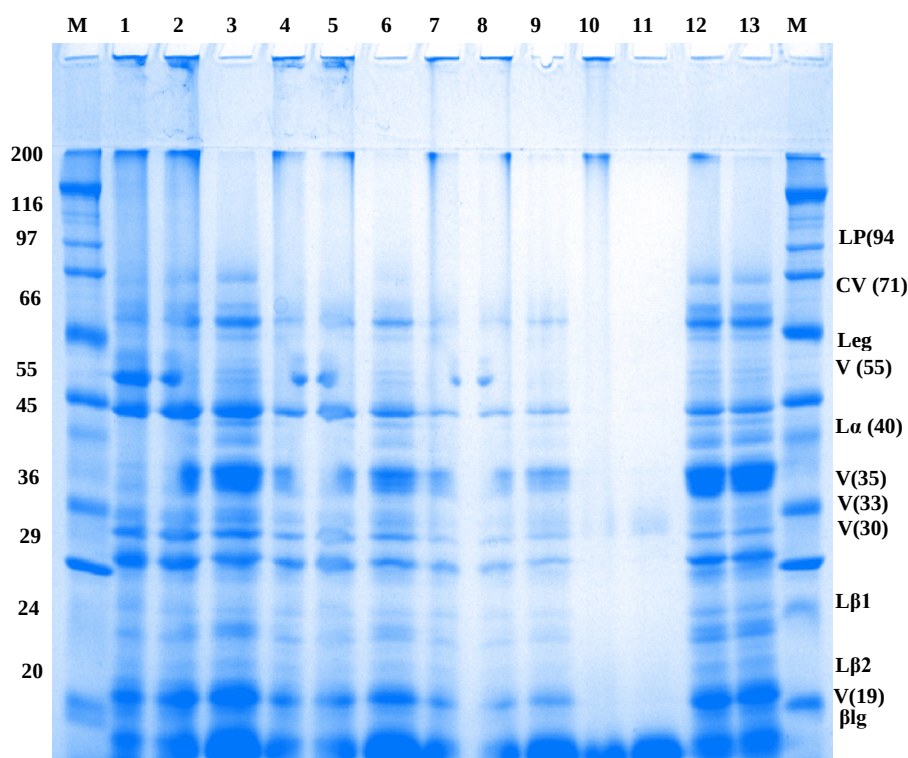


Figure.IV.7. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Natives (tampon + échantillon), Réductrice (SDS+DTT) et Non Réductrice (SDS) des agrégats solubles de β lg, Glob, et de leurs mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob à une force ionique de 100 mM NaCl. Puits 1, 2, 3 ratio 30/70 en N, CNR, CR; Puits 4, 5, 6 ratio 50/50 en CN, CNR, CR ; Puits 7, 8, 9 ratio 70/30 en CN, CNR, CR; Puits 10, 11 ; agrégats β lg en CNR, CR; Puits 12,13 agrégats Glob en CNR, CR. Marqueurs de masse molaire (kDa) ; $L\alpha$: polypeptide acide de la légumine; $L\beta_1, 2$: Polypeptide basique de la légumine; V: Vicilines; CV: convicine; LP: lipoxigénase, β lg: beta-lactoglobuline; Glob : globuline.

En ce qui concerne les mélanges β lg/Glob, le traitement thermique des dispersions protéiques à différents ratios massiques conduit à la polymérisation de ces protéines sous la forme d'agrégats solubles de masses moléculaires élevées (>200kDa). Ces agrégats restent piégés sur la surface du gel de concentration et séparation (puits 1, 2, 4, 5, 7,8). Une diminution progressive de ces agrégats solubles a été observée avec l'ajout de SDS, et une disparition totale a été observée dans les conditions réductrices.

L'analyse densimétrique montre que l'intensité relative de la bande de légumine dans les conditions natives (puits 1) était ~20% (très intense par rapport à celle obtenue dans la **Figure.IV.7**. Ce résultat indique que cette fraction ne participe pas dans les interactions protéine-protéine, et reste en coexistence avec les agrégats solubles formés, comme suggéré par **Mession, et al. (2013)**. L'intensité de cette fraction diminue proportionnellement à l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges.

En outre, et malgré la prédominance des interactions hydrophobes dans les agrégats mixtes de β lg/Glob formés, on observe également dans les mélanges à différents ratios des interactions covalentes entre les sous-unités $L\alpha$, $L\beta$ et la β lg (probablement de types échanges S'/SS), mais moins marquées que dans des conditions à force ionique faible (5mM en NaCl). En effet, il est constaté l'apparition des bandes $L\alpha$, $L\beta$ de faible intensité dans les conditions non réductrices (puits 2, 5, 8). Les bandes associées à ces fractions tendent à s'intensifier en présence de DTT (dans les conditions réductrices puits 3, 6, 9). Cela indique la participation des interactions covalentes entre sous-unités $L\alpha$, $L\beta$ et la β lg dans les mélanges protéiques.

Un comportement atypique a été signalé pour la fraction de convicine (~71 KDa). Cette fraction possède des acides aminés soufrés, mais elle s'agrège par l'implication d'interactions hydrophobes dans le cas d'agrégats de Glob purs. Le comportement d'agrégation de cette fraction a été modifié en présence de β lg dans les mélanges. L'intensité de cette bande s'intensifie dans les conditions non réductrices (puits 2, 5, 8) et beaucoup plus dans les conditions réductrice (puits 3, 6, 9). Sur la base de cette observation, il semblerait que cette fraction soit affectée par la formation de ponts disulfures en présence de β lg.

Toutefois, en fonction de l'intensité des bandes étudiée, et par comparaison à celle obtenue dans la **Figure.IV.6.**, nous pouvons observer qu'à une force ionique de 100 mM NaCl, l'application d'un traitement thermique sur les protéines seules et les mélanges donne :

- (i) d'avantage d'interactions non covalentes entre la β lg et/ou les différents fractions de Glob,
- (ii) et moins d'implication des liaisons covalentes entre la β lg et/ou les sous-unités de Glob possédant des acides aminés soufrés(**Chapitre IV.2 et 3**).

Afin de mieux comprendre la nature des fractions sédimentées sous forme d'agrégats insolubles (culots) lors du traitement thermique des différents échantillons préparés à une concentration de 2% à une force ionique de 100 mM NaCl, des analyses par SDS-PAGE ont également été conduites sur les culots de nos échantillons. Après re-solubilisation des culots (dilution d'un facteur 20) dans les différentes conditions souhaitées (conditions natives, conditions non réductrices, et condition réductrices), les Profils de migration électrophorétique des protéines chauffées seules ou en mélange ont présenté une forte similarité avec ceux évalués pour les agrégats solubles formés à la même force ionique de 100 mM en NaCl (résultat non montré). Il semble clair que sous l'effet de l'augmentation de la force ionique et la diminution des répulsions électrostatiques dans le système, les forces attractives non covalentes jouent un rôle très important dans l'agrégation des protéines et tend

à former des agrégats de haut poids moléculaire en fonction de l'apport de β lg dans les mélanges, ce qui favorise la sédimentation de ces agrégats insolubles sous forme de culots.

IV.5.2. Profils SDS-PAGE des agrégats formés en présence d'agent thiol-bloquant

Le composé *N*-Ethylmaleimide (NEM) est un réactif qui peut réagir avec les groupes sulfhydryle pour former un dérivé d'alkyle stable. Il est utilisé pour empêcher la formation de liaisons disulfures entre les protéines (**Creighton 1993**). Afin d'étudier les réactions d'échange de ponts disulfure entre les cystéines des deux protéines (légumine/conviciline et la β lg), nous avons préparé un mélange protéique β lg/Glob au ratio massique de 50/50 (concentration de 2% m/m, à 5 mM NaCl) en présence de 25 mM de NEM.

La composition polypeptidique du mélange protéique (β lg/Glob) au ratio 50/50, chauffé en présence de NEM et sans NEM (contrôle) préparés à une force ionique de 5 mM NaCl et une concentration protéique initiale de 2% est montrée dans la **Figure.IV.8**.

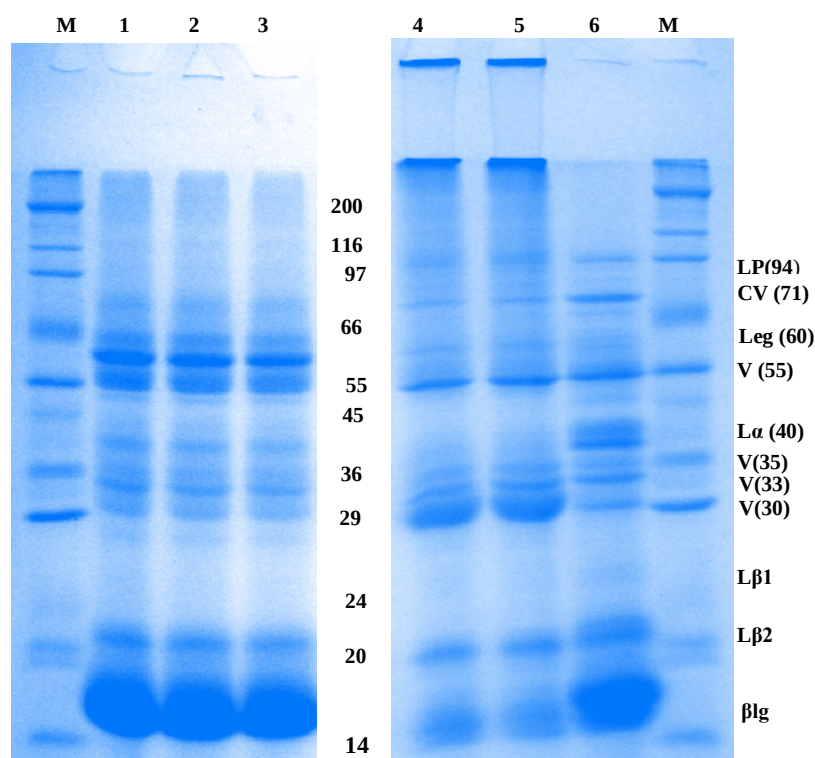


Figure.IV.8. Profil SDS-PAGE (12%), en Conditions Native, Condition non Réductrices et Condition Réductrices des agrégats solubles de mélange β lg/ Glob avec un ratio massique 50/50 à une force ionique de 5 mM NaCl. Puits 1, 2, 3 ratio 50/50 chauffés en présence de 25mM NEM, en CN, CNR, CR; Puits 4, 5,6 ratio 50/50 sans NEM en CN, CNR, CR. M : Marqueurs de masse molaire (kDa) ; $L\alpha$ et $L\beta_{1,2}$: polypeptide acide et basiques de la légumine ; V : vicilines; CV: conviciline; LP: lipoxigénase, β lg: β -lactoglobuline; Glob: globuline.

Comme il a été évoqué précédemment (**Figure.IV.6.**) le chauffage des protéines en mélange conduit à l'implication d'interactions intermoléculaires entre les deux protéines et la formation des agrégats de haut poids moléculaire (>200 kDa) dans les conditions natives et non réductrices (puits 4 et 5). Tandis que lorsque ces mélanges mixtes au ratio 50/50 ont été préparés en présence de NEM, le comportement de l'agrégation a changé par rapport à celui du témoin (ratio 50/50 chauffé sans NEM, **Figure.IV.8.**), et l'absence de formation d'agrégats solubles par ce type de liaisons a été observé (puits 1 et 2).

L'apparition de la bande de Légumine et des sous-unités dissociés de $L\alpha$, $L\beta$ et 1 monomère de β lg dans les conditions natives et non réductrices (puits 1,2), ainsi que l'absence de dépôt d'agrégats sur la surface du gel de concentration (puits 1, 2,) indiquent que les interactions covalentes ont été inhibées lors du chauffage en présence de NEM. Tandis que l'intensité de ces fractions (β lg, $L\alpha$ et $L\beta$) augmente uniquement dans les conditions réductrices (puits 5). Ce résultat est un autre indice du rôle de liaisons covalentes entre la β lg et/ou les sous-unités de Légumine lors de la formation des agrégats dans ce système binaire.

IV.5.3. Profils SDS-PAGE des agrégats issus de mélange de β lg et de légumine

IV.5.3.1. Purification des fractions de Globuline

Afin de bien comprendre le comportement d'agrégation (évoqué précédemment) par la formation des liaisons covalentes entre la fraction purifiée de légumine et β lg, nous avons décidé de fractionner les globulines par chromatographie échangeuse d'ions en utilisant un gradient de force ionique (**Gueguen, et al. 1984; O'Kane, et al. 2004a; O'Kane, et al. 2004b**) afin d'obtenir une fraction enrichie en légumine. Le principe de cette chromatographie est basé sur l'interaction de la charge négative des globulines à pH 7 à une amine quaternaire immobilisée sur des microbilles d'agarose (DEAE Sepharose).

L'augmentation progressive de la force ionique (de 5 mM à 2,5 M NaCl à pH 7) provoque l'élution des fractions de globulines les unes après les autres. La viciline est éluée la première pour une concentration en NaCl faible, suivie par la légumine à une force ionique supérieure (120 mM en NaCl). Les fractions ont été collectées par volume de 50 ml et l'absorbance de l'éluât a été mesuré à 280 nm. Une identification du contenu des éluâts a été faite par SDS-PAGE. Les fractions ont été ensuite concentrées, dessalées et lyophilisées.

Le profil d'élution des différentes fractions de viciline et légumine est présenté dans la **Figure.IV.9.** et la **Figure.IV.10.** D'après les résultats obtenus, il a été observé que les fractions de viciline et convicine (7S) ont commencé à apparaître à une force ionique faible (10 mM) contrairement à la légumine qui commence à être éluée à une force de 160 mM NaCl.

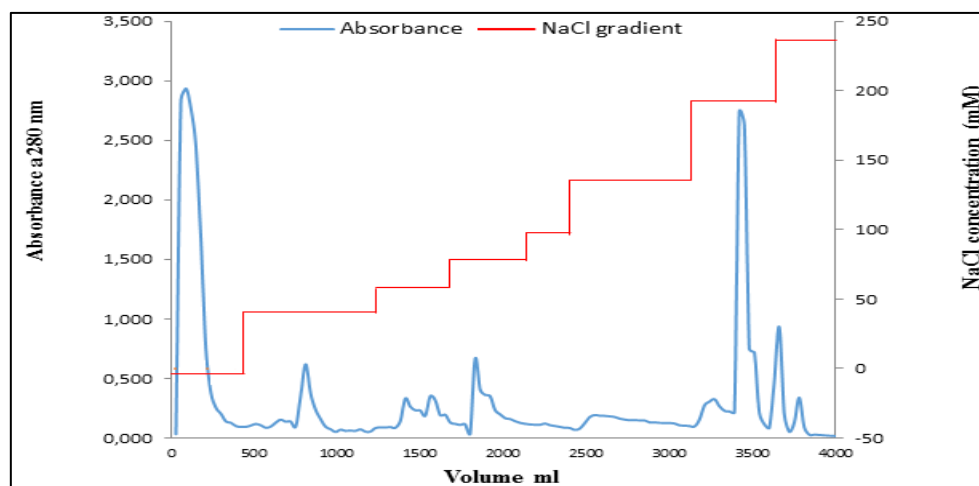


Figure.IV.9. Profil d'élution des fractions de viciline et légumine par une colonne d'affinité (DEAE sepharose) sous gradient linéaire de sel (NaCl) de 0-250 mM NaCl.

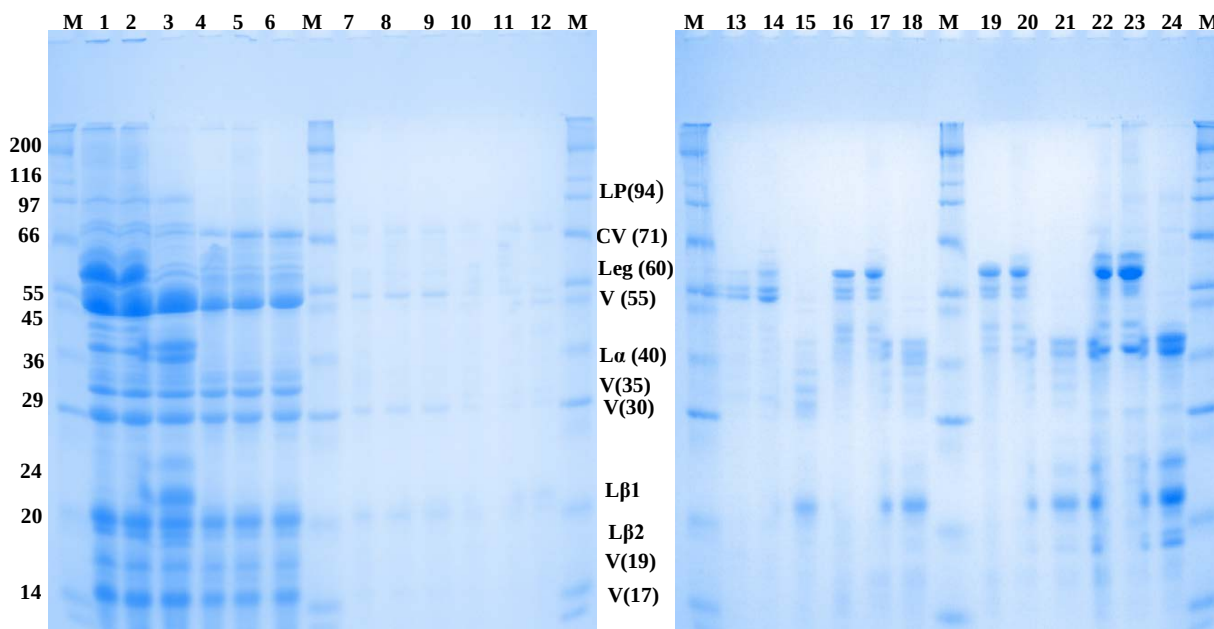


Figure.IV.10. Profil SDS-PAGE (15%) en Conditions Natives, Conditions non Réductrices et Réductrices (SDS+DTT) des différentes fractions après purification et concentration ; Puits 1, 2, 3: Glob en CNR et CR ; 4,5,6: fraction retenue (Viciline) 5mM NaCl en CN, CNR et CR ; 7,8,9 :fraction retenue à 50mM NaCl en CN, CNR, CR; Puits 10,11,12: fraction retenue 80 mM NaCl; 13, 14, 15: fraction retenue à 120 mM NaCl en CN, CNR et CR ; 16,17,18 : fraction retenue à 160 mM en CN, CNR et CR ; 19, 20, 21 : fraction retenue à 180 mM NaCl en CN, CNR CR ; Puits 22, 23, 24: fraction retenue à 250 mM NaCl en CN, CNR et CR. M: Marqueurs de masse molaire (kDa); L α : polypeptide acide de la légumine ; L β _{1, 2}: Polypeptide basique de la légumine ; V: Vicilines; CV: convicine; LP: lipoxygénase.

Des bandes caractéristiques des sous-unités de viciline (17-55 kDa) et convicine (71 kDa) ont été observées dans le puits 1, 2, 3 quelque soit les conditions natives, non réductrices et réductrices. L'intensité de ces bandes diminue en fonction du gradient imposé (puits 7-12). A partir d'une concentration de 120 mM en NaCl, nous avons remarqué l'apparition de la bande de légumine (60kDa) qui est sous forme dissociée $L\alpha$ (40 kDa) et $L\beta$ (20 kDa) dans les conditions réductrice (SDS+DTT). D'après l'analyse densitométrique, la fraction légumine obtenue présentait ~75% de pureté. Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de la littérature (**Gueguen, et al. 1984; O'Kane, et al. 2004a; O'Kane, et al. 2004b**). Après l'identification des fractions, les éluats de même type (7S et 11S) ont été rassemblés, dessalés et lyophilisés.

IV.5.3.2. Profils SDS-PAGE des agrégats formés à partir de β lg et des fractions isolées de légumine

Le profil électrophorétique des agrégats de β lg, légumine (Leg) et des mélanges de β lg/ Leg à différents ratios massiques 30/70, 50/50, 70/30, préparés à une concentration de 2 % (m/m) à 5 mM et à 100 mM NaCl sont montrés respectivement dans les **Figure.IV.11. et Figure.IV.12**. Le profil de migration de légumine (puits 1, 2 du gel de la **Figure IV.11.**) montre la présence de quelques traces de polypeptides de viciline qui sont considérés comme des contaminants.

Rappelons que dans la **Figure.IV.6. et 7**, lorsque l'électrophorèse a été effectuée pour des agrégats des Glob à une concentration de 2 % à différents forces ioniques de 5 et 100 mM NaCl, nous avons observé une dissociation totale des sous-unités de $L\alpha$ et $L\beta$ sous l'effet des conditions non réductrices et réductrices. Nous avons interprété ce phénomène de dissociation (l'absence de la bande légumine à 60 kDa) comme étant dû à l'absence d'échanges covalents (entre les sous-unités acides et basiques) dû à la faible concentration des fractions 11S en solution (2% de Glob dont ~0,56% de Leg). Le profil de migration des agrégats préparés à une concentration de ~2% de légumine (dont ~1,5% de Leg pure) présenté dans le puits 1 (**Figure.IV.11.**) a montré la présence de la bande légumine (60 kDa) relativement associé (présence de la bande de $L\alpha$ dans le même puits). Cela est en accord avec des résultats antérieurs concernant l'effet de la concentration protéique sur l'association des sous-unités acides et basique de 11S via des liaisons covalentes lors de la thermodénaturation de 11S de soja (**Mori, et al. 1982**). (cf. **Chapitre IV.5.1**).

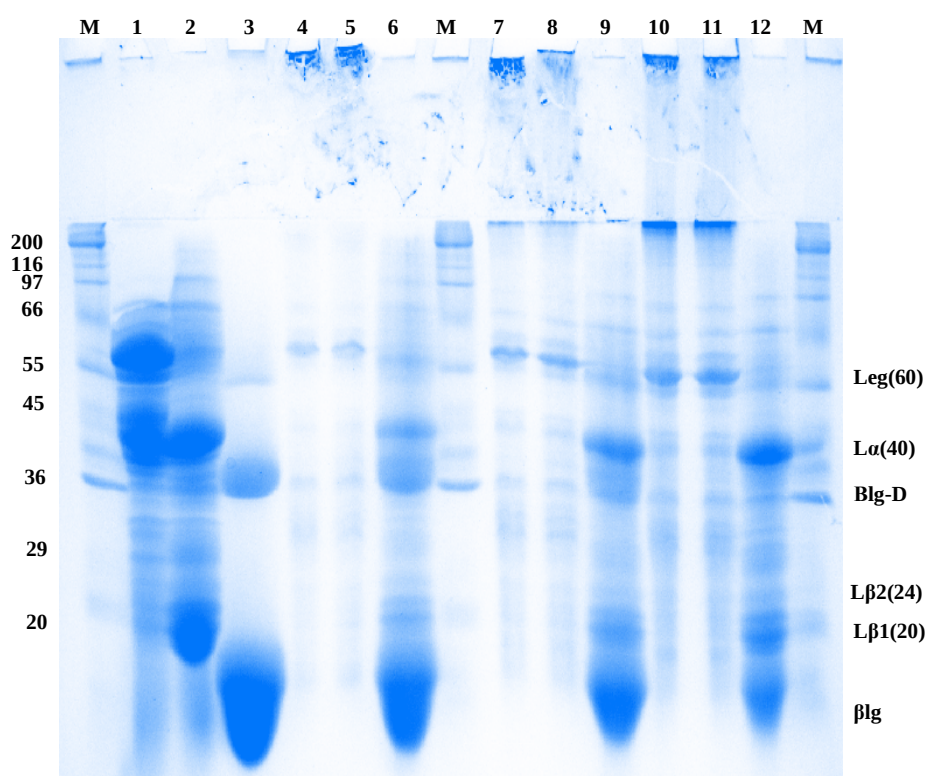


Figure.IV.11. Profil SDS-PAGE 10%, en Conditions Natives (CN), Non Réductrices (CNR) et Réductrices (CR) des agrégats de Leg et β lg, et leur mélanges β lg/Leg à différents ratios rapport massiques, à une force ionique de 5 mM et une concentration massique de 2%: Puits 1,2 agrégats de Leg en CNR et CR; Puits 3 agrégats de β lg en CR ; Puits 4, 5, 6 ratio 70/30 en CN, CNR et CR; Puits 7, 8, 9 ratio 50/50 en CN, CNR et CR; Puits 10, 11, 12 : ratios 30/70 en CN, CNR et CR; $L\alpha$: Polypeptide acide de la légumine; $L\beta_1, 2$: Polypeptide basique de la légumine; β lg ; beta-lactoglobuline; β lg-D: dimère

La thermodénaturation de la légumine génèrent des agrégats principalement par des liaisons non covalentes et qui sont rompues en présence de SDS (puits1), et en présence de DTT (conditions réductrice), la légumine (60 kDa) se dissocie complètement sous forme des sous-unités $L\alpha$ (20) et $L\beta$ (40) (puits 2; gels **Figure.IV.11.**).

Le chauffage du mélange de différents ratios massique de β lg/Leg conduit à la formation des agrégats de haut poids moléculaire suite à des interactions covalentes entre ces protéines. Ces agrégats restent piégés dans les conditions natives et non réductrices (puits 4,5, 7, 8, 10 et 11). Sous l'effet de DTT ces agrégats vont disparaître après le traitement des échantillons dans les conditions réductrices (SDS+DTT), conduisant à une dissociation complète des sous-unités de légumine $L\alpha$ et $L\beta$ et migration des fractions de β lg (Puits 6, 9, 12).

En ajoutant de β lg dans les mélanges, le comportement d'agrégation de $L\alpha$ change (puits 5, 8, 11) par rapport de celui observé pour les agrégats de légumine seule (puits 1). La consommation de cette sous-unité ($L\alpha$) dans les conditions non réductrices est une indication de l'implication de cette dernière via des liaisons covalentes avec la β lg pour former des agrégats. Cette observation n'exclue pas la probabilité de participation de $L\beta$ dans la formation d'agrégats par ce type de liaisons covalente.

Selon le profil électrophorétique des mélanges (β lg/Leg), il a été observé l'apparition d'une bande de légumine (60 kDa) dans les conditions natives, dont l'intensité augmente avec la diminution de la proportion de β lg dans les mélanges, respectivement pour les mélanges 70/30, 50/50, 30/70 (Puits 5, 8, 10). Ce résultat était concordant avec celui concernant les mélanges (β lg/Glob). Il semblait qu'une partie de cette fraction (de 6 à 15%) s'agrège par des interactions hydrophobes et ne participe pas dans les échanges covalents.

IV.5. Propriété thermiques des agrégats solubles

La dénaturation des molécules la β lg et de Glob met en jeu différents mécanismes qui ont été largement décrits dans la littérature (**de Wit 2009; Liu, et al. 1994; Qi, et al. 1995; Renard 1994; Shand, et al. 2007; Sun & Arntfield 2010**). En général, pour la dénaturation de β lg (modèle de protéines globulaires) le processus se développe en deux étapes principales. Le premier processus est endotherme et consiste en un déplissement des protéines. Il s'agit d'une évolution de l'équilibre entre les dimères et les monomères natifs et non-natifs couplée à des réarrangements intramoléculaires réversibles ou irréversibles (par exemple, par rupture des ponts hydrogène). Une seconde étape d'agrégation fait intervenir principalement des réactions de thiol oxydation et des échanges de ponts disulfures SS (en moindre mesure pour les globulines végétales), et implique des interactions non-covalentes dont des liaisons hydrophobes (d'une grande ampleur pour les globulines végétales). L'agrégation débute par la formation de dimères non-natifs et d'oligomères qui vont croître rapidement en fonction du milieu et de la température appliquée (**Le Bon, Nicolai & Durand, 1999**).

La formation de interactions hydrophobes et covalentes durant l'agrégation est légèrement exotherme (**Ma & Harwalkar 1991; Privalov & Khechinashvili 1974**). Toutefois, les deux étapes du processus ne peuvent pas être clairement séparées, sauf dans quelques conditions très particulières de pH et de force ionique, mais qui sont très éloignées de nos conditions de travail. Par conséquent, un seul pic endotherme est normalement visible

par analyse enthalpique différentielle, bien que celui-ci soit le résultat d'une combinaison de phénomènes endothermes et exothermes.

L'estimation du degré de thermodénaturation des différents échantillons protéiques a été effectuée par une analyse enthalpique différentielle adaptée (micro-DSC). Les valeurs de température de dénaturation thermique et les thermogrammes de β lg de Glob et des différents mélanges β lg/Glob préparés à 5 et 100 mM NaCl à pH 7,2 sont présentés dans le **Tableau.IV.2.** et la **Figures.IV.12.**

Nous avons montré précédemment que les propriétés thermiques de β lg et Glob (Cf **Chapitre III.1.7** et **III.2.7**) sont affectées par l'ajout de sel conduisant à l'augmentation de la stabilité thermique des échantillons étudiés à 100 mM par rapport à ceux étudiés 5 mM NaCl.

De même, nous avons mentionné que la dénaturation des deux protéines aux deux forces ioniques était irréversible. Concernant les thermogrammes des mélanges β lg/Glob (**Figure.IV.12.**), une seule transition endothermique a été notée avec la disparition du petit chevauchement de pic attribué à la fraction légumine (Cf **Chapitre III.1.7**). Une seule transition endothermique correspond à la dénaturation simultanée dans le même domaine de température des fractions (β lg et Glob) en mélange.

Ces observations, ont été enregistrées pour tous les mélanges quelque soit le ratio massique (β lg/Glob) et la force ionique (5 et 100 mM NaCl). Nous pouvons supposer que la réassociation des monomères actifs de la β lg et de la légumine ($L\alpha$) affecte leurs dénaturations respectives (Cf. **Figure.IV.11.**), ce qui conduit à des effets coopératifs ne laissant apparaître qu'une seule transition.

Des résultats proches ont été rapportés dans la littérature (**Beliciu & Moraru 2011; Messiou, et al. 2015b**), décrivant le changement de propriétés thermiques de protéines sous l'effet de la présence de protéines différentes en mélange. Une augmentation de la stabilité thermique des globulines 11S (légumine de pois) sous l'effet de micelles de caséine dans des solutions a été observée par **Messiou, et al.(2015b)**. Les auteurs suggèrent que l'effet de l'encombrement stérique imposé par la caséine dans le mélange protéique limite la mobilité moléculaire et la flexibilité de la légumine de pois, affectant par la suite le déplissement de ces fractions.

Tableau.IV.2. Données d'analyse thermique de β lg, de Glob et des mélanges de protéines à différents ratios massique β lg/Glob, à différentes forces ioniques (5 et 100 mM NaCl) à pH 7,2.

Echantillons	100% β lg / 0 Glob			30/70			50 /50			70 /30			0 β lg / 100% Glob		
	T_0	T_d	ΔH_d	T_0	T_d	ΔH_d	T_0	T_d	ΔH_d	T_0	T_d	ΔH_d	T_0	T_d	ΔH_d
	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(J/g)
à 5mM NaCl	68,18	70,79	7,96	67,37	75,1	11,6	63,68	74,49	12,5	64,3	73,22	13,33	64,22	75,62	14,44
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,79	0,77	0,25	1,26	0,26	0,05	1,37	0,04	0,04	0,17	0,45	0,01	0,79	0,6	0,17
à 100mM NaCl	68,58	73,74	9,43	70,85	78,8	13,15	67,38	77,37	14,75	62,21	74,98	15,41	71,24	85,16	15,41
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,09	0,2	0,02	2,49	1,42	0,02	0,21	0,12	0,007	4,24	0,08	0,7	0,6	0,07	0,09

Nous pouvons remarquer que la température de thermodénaturation (T_d) diminue avec la proportion de β lg dans les mélanges. Les valeurs de T_d mesurées pour les mélanges β lg/Glob chauffés à 5 mM étaient respectivement de ~ 75 , ~ 74 et ~ 73 °C pour les ratios massiques 30/70, 50/50 et 70/30. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mélanges β lg/Glob thermisés à 100 mM NaCl.

Par ailleurs, la valeur de ΔH_d était légèrement inférieure pour les mélanges par rapport à celle mesurée dans le cas des Glob seules. Cela pourrait être attribué à l'abaissement de réactions endothermiques et/ou la moindre mesure des réactions exothermiques lors de dénaturation thermique et l'agrégation simultanée de légumine et de β lg (Choi & Ma 2006; Unterhaslberger, et al. 2006).

Dans le cas des mélanges β lg/Glob, la température de dénaturation a augmenté considérablement à 100 mM par rapport à celle mesurée pour les mélanges dénaturés à 5 mM NaCl (Tableau.IV.2.). Cela indique une augmentation de la stabilité thermique en fonction de l'ajout de sel (Cf Chapitre III.2.7).

Afin de vérifier la dénaturation complète des fractions protéiques qui composent les agrégats mixtes, une analyse enthalpique a été effectuée sur les mélanges thermodénaturés à une température de 85 °C pendant une heure (données non montrées). L'absence de transition thermique lors d'un nouveau chauffage a indiqué une dénaturation irréversible des protéines.

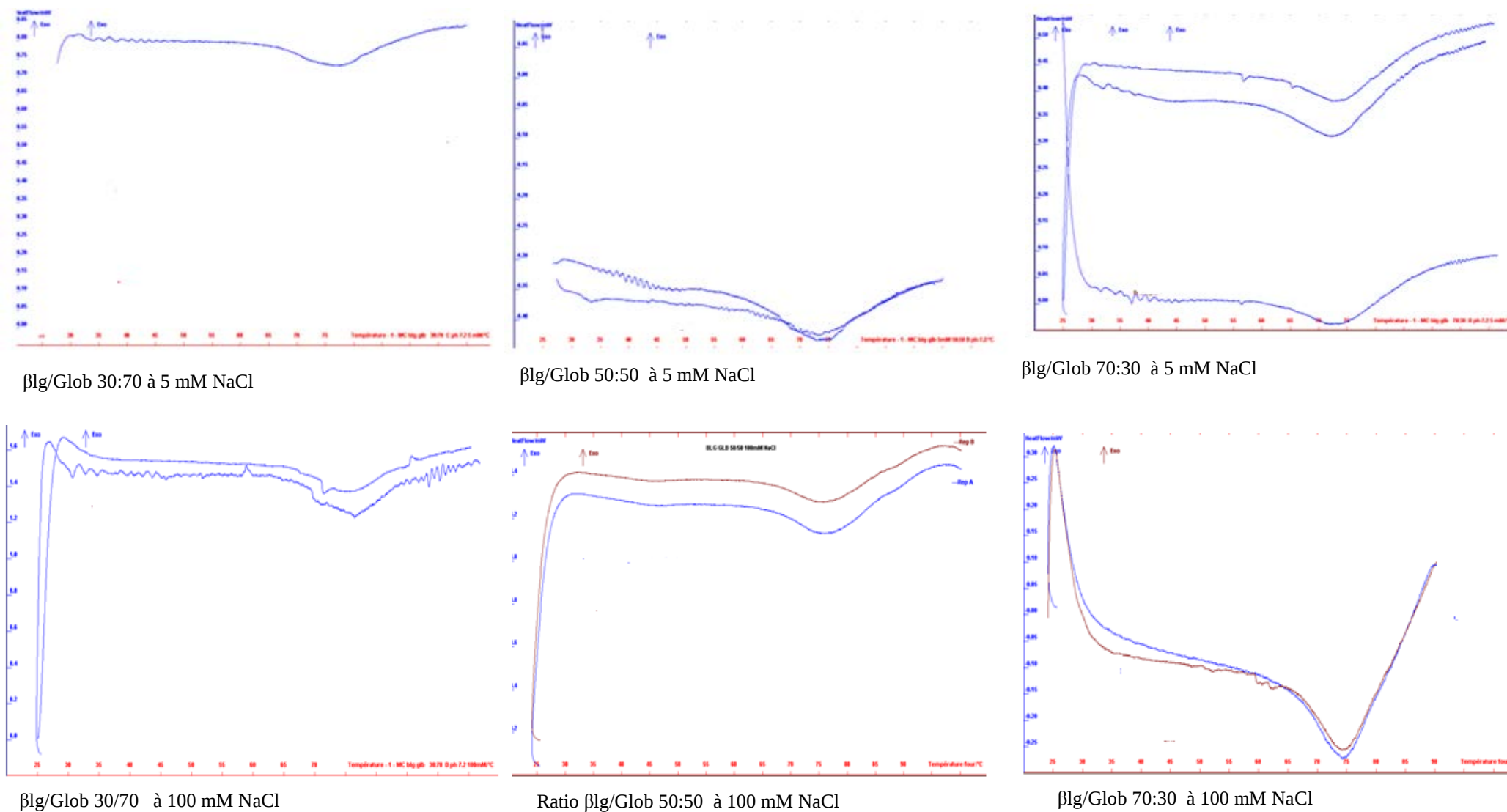


Figure.IV.12. Thermogrammes de mélanges β lg/ Glob a 2% (m/m) chauffée à 1 °C/min, à une force ionique de 5 et 100 mM NaCl, à pH 7.2.

IV.6. Caractérisation de la taille des agrégats mixte par DLS

IV.6.1. Distribution de taille des agrégats formés à faible force ionique

Après avoir déterminé les interactions possibles entre les différentes fractions de Glob et β lg, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la taille des agrégats afin de mettre en évidence une éventuelle différence entre les deux types de protéines dans les mélanges (β lg/ Glob) à différents ratios.

La distribution de taille des particules et le diamètre hydrodynamique moyen (D_h) des protéines natives et des populations d'agrégats solubles de β lg, de Glob et des mélanges à différents ratios β lg/Glob a été mesurée par DLS. Les différents résultats sont présentés dans les **Figure.IV.13.**, **Figure.IV.14.**, et le **Tableau.IV. 3.**

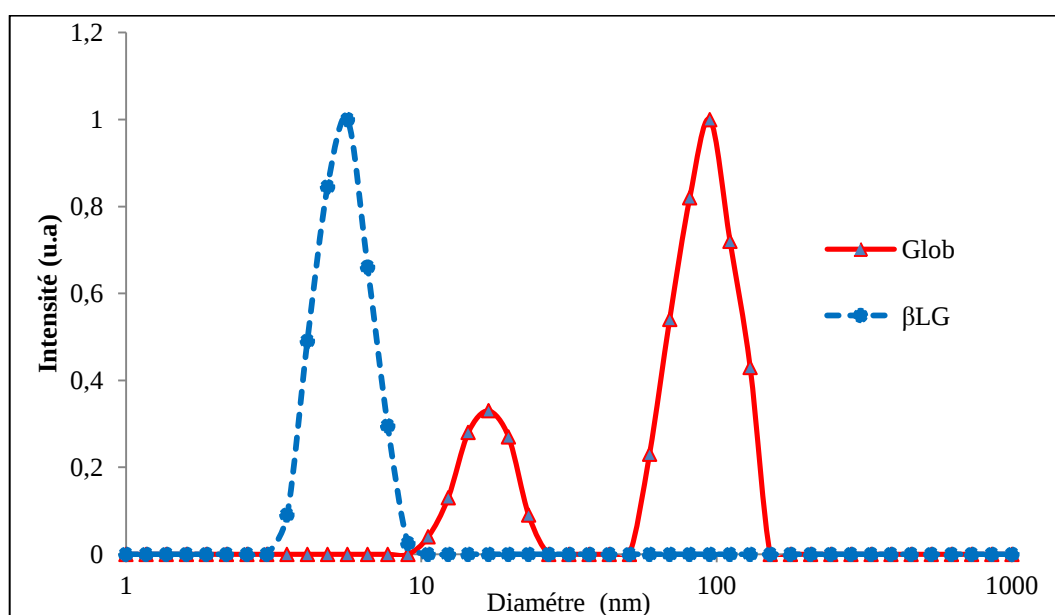


Figure.IV.13. Distribution de taille des protéines natives de β lg et de Glob à une concentration de 2 %, à 5 mM NaCl et pH=7,2, à une dilution de 0.1 %.

Le diamètre hydrodynamique moyen (D_h) obtenu pour la β lg native est de ~ 6 nm avec une distribution monomodale (**Figure.IV.13.**). Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte que le (D_h) est compris entre 4-6 nm pour la β lg native dans une gamme de pH 6-7 (**Durand, et al. 2002; Mehalebi, et al. 2008; Nicolai, et al. 2011**). En revanche, la distribution de la taille de la Glob native est bimodale. Les particules d'environ 15 nm peuvent correspondre aux oligomères 7S / 11S, alors que ceux de 100 nm pourraient

correspondre à des grosses particules protéiques formées pendant la préparation des Glob ou initialement présents à l'état natif. Des résultats proches ont été rapportés pour les globulines 11S de soja (Li, et al. 2007).

Tableau.IV.3. Distribution de taille et diamètre hydrodynamique Dh pour (a): échantillons non chauffés et (b): agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg / Glob). "Particules 1" et "Particules 2" ont été attribuées respectivement aux particules de petite taille et aux particules de grande de taille. Le pourcentage (%) indique le % d'intensité de signal de chaque population (somme de P1 et P2 égale à 100 % pour le même échantillon).

		Diamètre moyen des particules (Dh) (nm)				
Echantillons (β lg/Glob)		0/ 100	30/70	50/50	70/30	100/0
Distribution de taille						
(a)	particules 1	16,9 $\pm$ 5,6	nd	nd	nd	6 $\pm$ 0,4
	(%)	56 $\pm$ 1,5	nd	nd	nd	100
	particules 2	94,5 $\pm$ 1,5	nd	nd	nd	*
	(%)	43,9 $\pm$ 0,4	nd	nd	nd	*
(b)	particules 1	69,3 $\pm$ 5,6 a	43,2 $\pm$ 0,2 b	37 $\pm$ 3,6 bc	27 $\pm$ 0,3 c	*
	(%)	63,1 $\pm$ 1,5	28,9 $\pm$ 2,4	15,6 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,2	*
	particules 2	151,9 $\pm$ 9,8 a	111 $\pm$ 10,1 b	95 $\pm$ 8,32 c	94,9 $\pm$ 0,1 c	38 $\pm$ 0,07 d
	(%)	36,9 $\pm$ 0,4	71,1 $\pm$ 2,2	84,4 $\pm$ 0,8	97,7 $\pm$ 0,6	100

Tous les résultats sont donnés en moyenne $\pm$ écart type, calculés à partir d'au moins cinq répétitions. Les moyennes portant la même lettre (ad) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). * Absence de pic, nd: non déterminé.

Le **Tableau.IV.3.** montre la distribution de taille et le diamètre moyen des particules des différents échantillons étudiés. Les résultats expérimentaux montrent que la dénaturation thermique favorise l'agrégation des protéines. Cela se traduit par l'augmentation du Dh des différents échantillons par rapport aux protéines natives.

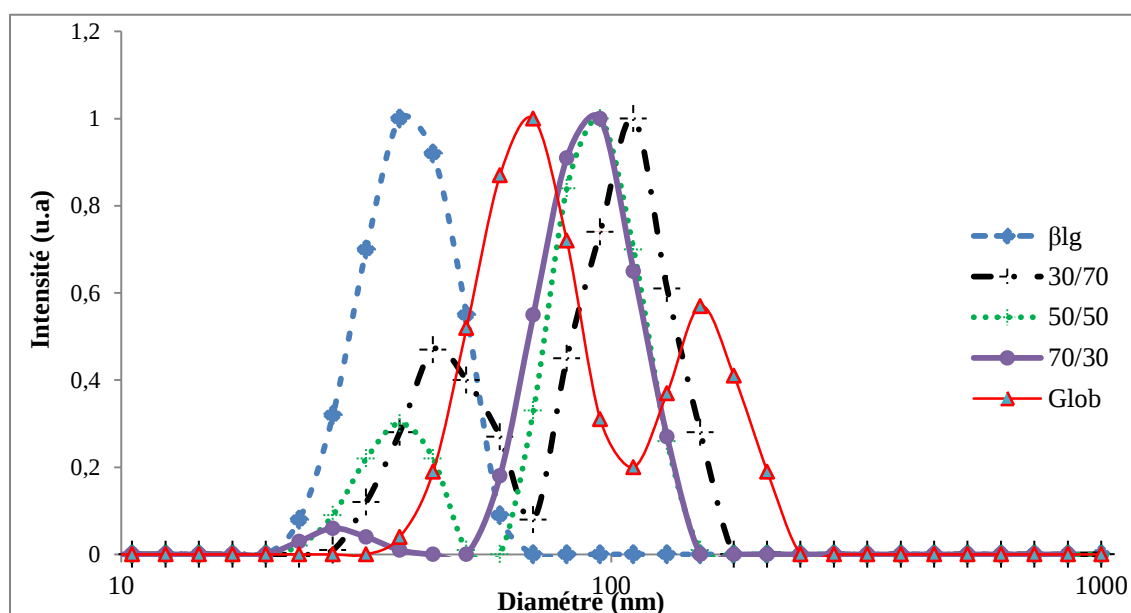


Figure.IV.14. Distribution de taille des agrégats protéiques de β lg, Glob et des agrégats issus de mélanges (β lg/Glob) à différents ratios 30/70, 50 /50, 70 /30, préparés à une concentration de 2%, 5 mM NaCl, pH 7,2 et à une dilution de 0,1%.

Les agrégats de β lg formés après une dénaturation thermique à 85 °C pendant 60 min, donnent une distribution monomodale des particules plus large que celle des β lg natives, avec un $D_h \sim 40$ nm (**Figure.IV.14.**). Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs (**Hoffmann & van Mil 1997; Ryan, et al. 2012; Schmitt, et al. 2007**). Dans cette étude, à un pH 7,2, loin du pI de la β lg, l'obtention de ce D_h pour les agrégats formés peut être attribuée : (i) à l'augmentation de la charge répulsive intermoléculaire, qui limite d'une manière générale une sur-agrégation et met fin à la croissance des agrégats (**Schokker, et al. 1999**), (ii) à un temps de chauffage prolongé conduisant à la formation de petits agrégats non sédimentables caractérisés par un $D_h \leq 50$ nm (**Donato, et al. 2009**).

Dans les conditions expérimentales choisies, les résultats obtenus par DLS montrent l'absence d'agrégats intermédiaires (**Figure.IV.14. et Tableau.IV.3.**). Cela peut s'expliquer qu'à pH 7-8 et à température élevée, une dissociation rapide de β lg s'opère avec une augmentation du taux de conversion des protéines natives en monomères actifs, ce qui induit une agrégation rapide et centrée sur une seule population d'agrégat (**Hoffmann & van Mil 1999**). Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés dans la littérature (**Hoffmann & van Mil 1999; Mehalebi, et al. 2008; Schmitt, et al. 2007; Schokker, et al. 1999**).

En ce qui concerne les agrégats de Glob, l'analyse par DLS montre une distribution bimodale avec une augmentation du Dh des particules agrégées. Le premier pic (première population) de Dh ~ 70 nm indique la présence probable d'oligomères peu agrégés et/ou de sous-unités dissociées thermiquement. La présence de la deuxième population (~ 150 nm) peut s'expliquer par la formation de larges particules protéiques agrégées.

Ces résultats sont proches de ceux concernant la taille d'agrégats de protéines de soja mesurée par (LLS) (light laser scattering) décrits dans les travaux de **Li, et al. (2007)**, **Munialo, et al. (2014)** ont obtenus une distribution monomodale des particules avec un Dh ~ 190 nm à pH neutre pour les globulines de pois. Ce résultat différent peut être attribué à des conditions expérimentales différentes comme la haute température de chauffage (95°C) et la plus forte concentration protéique utilisée dans leurs études. Outre la température de chauffage et la concentration en protéines, le pH et la force ionique déterminent aussi l'ampleur des interactions protéine-protéine et donc la taille des agrégats dans la dispersion protéique de pois (**Liang & Tang 2014; Munialo, et al. 2014**).

Dans le cas des mélanges ($\beta\text{lg}/\text{Glob}$), la distribution des particules obtenues était bimodale pour tous les mélanges $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ après une dénaturation thermique (**Figure.IV.14.** et **Tableau.IV.3.**). Le Dh moyen des agrégats formés à base des mélanges $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ a diminué, en fonction de l'augmentation la proportion de βlg dans les mélanges, en restant toujours inférieur au Dh mesuré pour les agrégats de Glob. Par contre, une diminution du taux relatif des particules des premières populations relatives aux oligomères et sous-unités protéiques dissociées thermiquement est observée en fonction de l'augmentation de la proportion de βlg dans les mélanges. Simultanément une augmentation considérable de la teneur relative des particules de la deuxième population (agrégats de Dh élevé) est enregistrée. Bien que la distribution en intensité donne plus de poids aux particules de diamètre élevé, conformément à l'approximation de Rayleigh en mesure DLS, ceci correspond à une participation plus importante des sous-unités de globulines dans les agrégats $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ de grande taille avec l'augmentation du ratio $\beta\text{lg}/\text{Glob}$.

Par ailleurs, la diminution globale du Dh des agrégats mixtes avec l'augmentation du ratio $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ pourrait être due principalement au nombre conséquent de liaisons covalentes créées dans les agrégats protéiques, comme il a été évoqué précédemment dans la partie SDS-PAGE et par détermination du contenu S $^{\circ}$ /SS. En effet, **Schmitt, et al. (2007)** ; **Renard, et al. (1994)** ; **Hoffman, et al. (1999)** ont indiqué qu'à pH neutre et en absence de sel, la

formation de liaisons covalentes entre les agrégats de β lg limite et réduit la taille des agrégats plus que par l'intermédiaire d'interactions non-covalentes (**Schokker, et al. 2000**). Ceci conduirait donc à la formation d'agrégats mixtes compacts et de diamètre moyen réduit.

IV.6.2. Distribution de taille des agrégats formés à une force ionique élevée (100 mM NaCl).

La distribution de taille et le diamètre moyen des particules des différents échantillons étudiés à une force ionique de 100 mM NaCl, est montré dans la **Figure.IV.15.** et **Tableau.IV.4.**

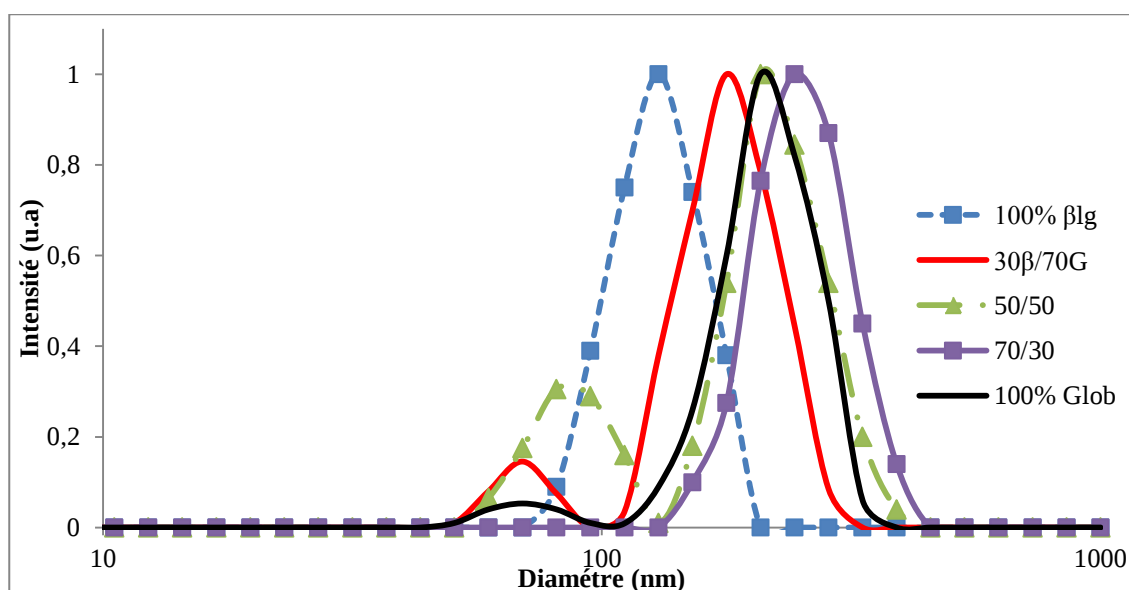


Figure.IV.15. Distribution de taille des agrégats protéiques de β lg, Glob et des agrégats issus de mélanges (β lg/Glob) à différents ratios 30/70 ; 50 /50 ; 70 /30 préparés à une concentration de 2%, 100 mM en NaCl, pH7,2 et à une dilution de 0,1%.

Les résultats expérimentaux montrent que la dénaturation thermique des protéines dans un milieu salin (100 mM NaCl) favorise l'agrégation intensive de ces particules conduisant à la formation de complexes protéiques insolubles en fonction de la quantité de β lg dans le mélange, comme il a été évoqué dans le **Chapitre IV.1**. Nous avons constaté que les différents agrégats solubles (surnageant) présentent un Dh plus élevé par rapport à celui obtenu dans la condition 5 mM NaCl.

Les agrégats de β lg présentent un Dh $\sim$ 130 nm avec une distribution monomodale. Cette valeur est supérieure à celui rapporté dans la littérature par **Verheul, et al. (1998)**. Cela est dû à la différence de concentration et de température de dénaturation utilisées par ces derniers, car ces paramètres affectent la taille des agrégats formés. Il a été signalé aussi dans

la littérature que le Dh d'agrégats de β lg est dépendant de la force ionique et de la concentration protéique (**Baussay, et al. 2004**). L'augmentation du Dh dans ce cas traduit la diminution des répulsions intermoléculaires entre protéines en raison de l'écrantage des groupes chargés par les contre-ions, ce qui augmente le taux d'agrégation des protéines notamment via des interactions hydrophobes. De plus, à cette force ionique, **Schokker, et al. (2000)** ont proposé que l'agrégation peut se produire de façon aléatoire et provoque une diminution de la solubilité, ce qui explique la forte précipitation de β lg après une centrifugation (**Chapitre IV.1**).

Tableau.IV.4. Distribution de taille et diamètre hydrodynamique Dh des agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg / Glob). "Particules 1" et "Particules 2" ont été attribuées respectivement aux particules de petite taille et aux particules de grande taille. Le pourcentage (%) indique le % d'intensité de signal de chaque population (somme de P1 et P2 égale 100% pour le même échantillon).

Echantillons		Diamètre moyen des particules (Dh) (nm)				
		(βlg/Glob)	0/100	30/70	50/50	70/30
Distribution de taille						
particules 1		70,1 ± 4,3 a	70.3± 0,2 a	95± 3,6 b	*	*
	(%)	10,2 ± 1,2	19,9 ± 2,4	31,6 ± 1,2	*	*
particules 2		208,5 ± 1,5c	177 ± 10,1 b	208± 1,3c	243,8 ± 2,2 d	129± 0,4 a
	(%)	89,8 ± 1.1	80.1 ± 2,2	69,4 ± 1,8	100 ± 0,6	100

Tous les résultats sont donnés en valeur moyenne $\pm$ écart type, calculée à partir d'au moins cinq répétitions. Les moyennes portant la même lettre (ad) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). * Absence de pic, nd: non déterminé.

Dans le cas des agrégats de Glob, les valeurs de Dh sont plus élevées que celles obtenues pour les agrégats thermisés à 5 mM NaCl. Une distribution bimodale a été constatée avec un Dh qui atteint ~ 209 nm pour la deuxième population P2 ; l'autre population P1 correspond probablement à des fractions formant des agrégats intermédiaires à ~ 70 nm. Lorsque l'on suit l'évolution du Dh et la distribution de taille obtenues dans les mélanges (β lg /Glob), on note une influence du ratio β lg/Glob sur l'allure des pics obtenus (**Figure.IV.16.** et **Tableau.IV.4.**). Pour les agrégats issus de mélanges, on observe que la population P1

augmente en fonction de la proportion de β lg dans les mélanges aux ratios massiques β lg/Glob de 30/70 et 50/50 formant une distribution bimodale dans ces mélanges. Par contre, au ratio 70/30, il a été constaté la disparition totale de cette population (P1) et l'obtention d'une distribution monomodale avec un $D_h \sim 243$ nm.

Il semblerait donc que l'agrégation simultanée des deux protéines à 100 mM NaCl conduit à l'augmentation du D_h des agrégats intermédiaires P1 (pour les ratios 30/70 et 50/50). On observe également que le D_h de P2 est contrôlé par l'apport massique de β lg, inversement à ce qui était observé dans la condition 5 mM pour les plus gros agrégats dans les mélanges. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation des forces physiques (liaisons non covalentes) entre les agrégats. Cette augmentation des interactions non covalentes est favorisée par la diminution des répulsions électrostatiques entre les particules conduisant à la formation plus aléatoire de gros agrégats.

IV.7. Caractérisation des agrégats mixtes par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC)

Afin de mieux comprendre l'évolution des différentes populations protéiques dans les mélanges de β lg/Glob après le traitement thermique, nous avons caractérisé les protéines natives et les agrégats issus de mélanges (préparés à une force ionique de 5 ou 100 mM NaCl) par une analyse SEC-HPLC. Cette technique permet de visualiser la distribution des différentes populations protéiques en fonction de leurs poids moléculaires.

Les analyses de SEC-HPLC ont été effectuées sur des échantillons natifs de β lg et Glob, sur des agrégats de β lg et Glob, ainsi que sur des mélanges obtenus à différents ratios massiques β lg/Glob après dénaturation thermique. Les résultats sont montrés dans la **Figure.IV.16.**, la **Figure .IV.17.** et le **Tableau.IV.5.** Le volume total de la colonne était de 14,34 ml et le volume mort (V_0) de 4,3 ml.

Les résultats présentés dans la **Figure.IV.16.** montrent que le profil d'élution de β lg native donne un seul pic large, qui correspond à un poids moléculaires (M_w) entre ~ 45 kDa et 13,7 kDa conformément au poids estimé par la calibration de colonne. Ce résultat traduit la présence de β lg sous forme de dimère (36kDa), et de monomères à un volume d'élution (v_e) de 12,36-13,59 ml qui correspond à $M_w \sim 18$ kDa. Il a été rapporté que l'équilibre entre les formes monomères et dimères de β lg est dépendant de différents facteurs comme la température, la concentration protéique, le pH et la force ionique (**Schokker, et al. 1999**).

Le profil d'élution de Glob à l'état natif indique la présence de deux pics majeurs G_1 , G_2 et trois épaulements G_3 , G_4 , G_5 (**Tableau.IV.5.**). Le premier pic G_1 , correspondait à un M_w compris entre ~ 660 kDa et 443 kDa, le pic G_2 à un M_w compris entre ~ 443 kDa et 220 kDa ; les épaulements G_3 , G_4 , représentaient des polypeptides ayant un M_w variant entre 43 et 13.5 kDa ; un dernier épaulement G_5 présentait un $M_w \leq 13.5$ kDa.

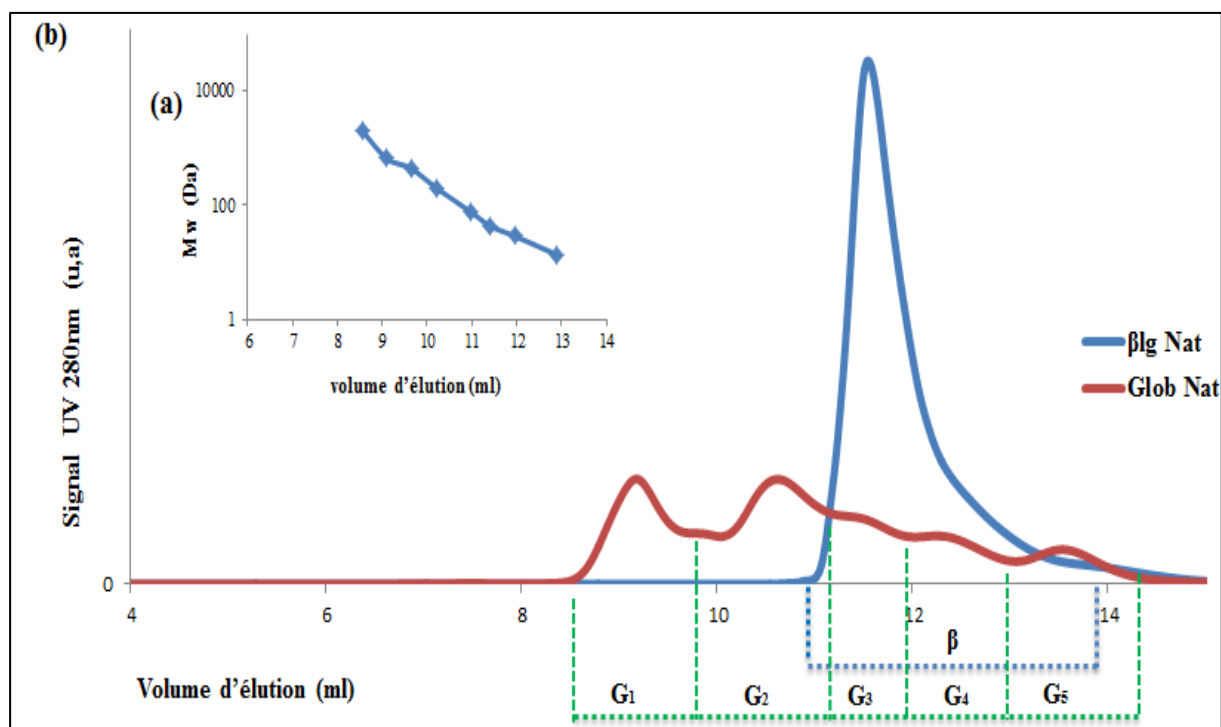


Figure.IV.16. Profils SEC-HPLC des Glob et β lg étudiés. **(a):** courbe d'étalonnage de la colonne TSK G 6000 PW_{xl}, calibré par une série avec des marqueurs de différents poids moléculaires: Bleu de dextran (2000 kDa), la thyroglobuline (669 kDa), apoferritine (443kDa), β -amylase (200kDa), conalbumine (75kDa), d'ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (MW: 29 kDa), ribonucléase A (13,7 kDa), avec un débit de $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. **(b):** protéine native (β lg, Glob) à une concentration initiale de 2 %. Les spectres ont été divisés en plusieurs gammes d'élution, selon le volume d'élution et le poids moléculaire des marqueurs utilisés. β : β lg non chauffé; G_1 -5: fractions éluées de Glob native.

Le profil obtenu des fractions de Glob native présente des poids moléculaires légèrement plus élevés que les valeurs trouvées dans la littérature (**Marcone, et al. 1998b; Messian, et al. 2013**). Cela peut être dû aux conditions d'extraction de Glob à faible force ionique qui auraient favorisé l'agrégation de certaines fractions protéiques (légumine) (**Gueguen, et al. 1988**).

Malgré tout, ces pics peuvent être attribués aux fractions protéiques connues des globulines: (G_1) agrégats de globulines; (G_2) hexamères de légumine 11S ($M_w \sim 360$ kDa), tétramères de convicine 7S ($M_w \sim 210$ -280 kDa) et trimères de viciline 7S ($M_w \sim 150$ kDa),

monomères de légumine (60 kDa) et de convicine (71 kDa) ; (G_3) monomères de viciline (~50 kDa) ; (G_4, G_5) sous-unités de viciline (12,5-35 kDa) fragmentées par la protéolyse après biosynthèse des polypeptides (**Matta, et al. 1981**) et dissociées sous l'effet de l'extraction et de l'augmentation des répulsions électrostatiques à faible force ionique comme indiqué par de nombreux travaux antérieurs (**Gueguen 1989; Gueguen, et al. 1988; Guo, et al. 2015; Karaca, et al. 2011; Marcone, et al. 1998b; Mession, et al. 2013**).

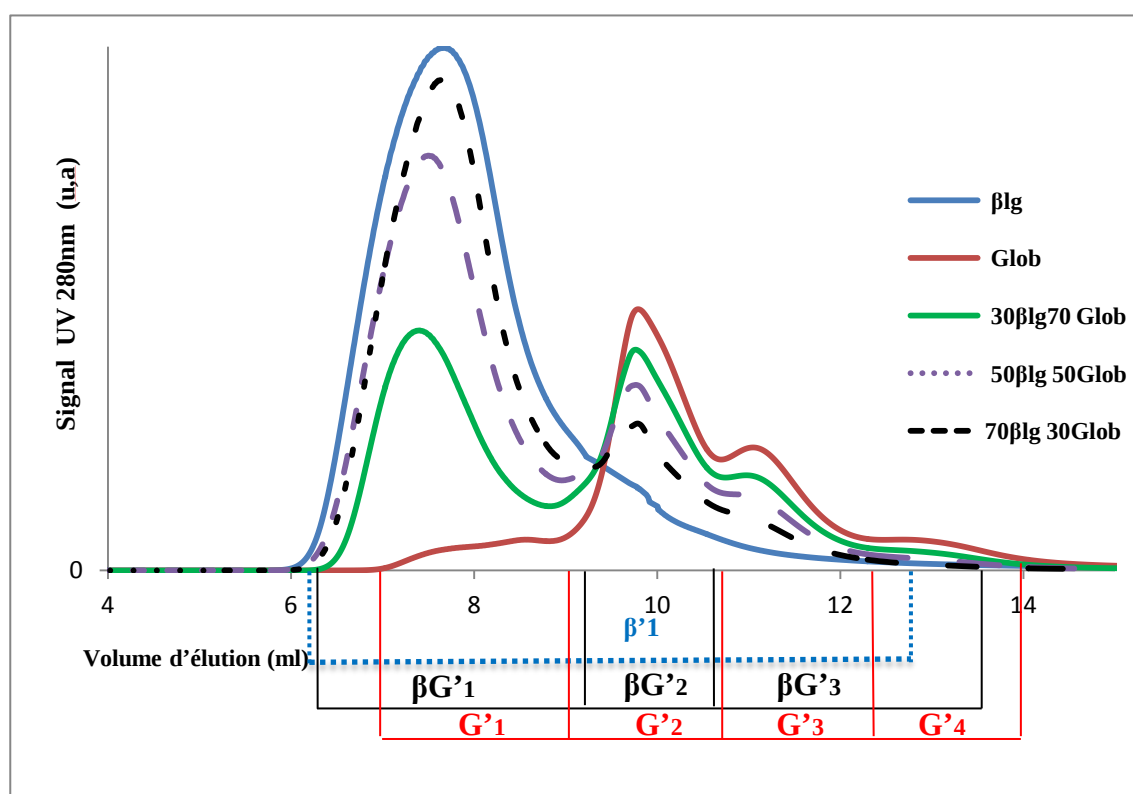


Figure.IV.17. Profils SEC-HPLC des agrégats de β lg, Glob et des mélanges (β lg/Glob) à différents ratios (30/70, 50/50, 70/30), préparés à 85 °C pendant 60 min, et à une concentration initiale de 2%, à une force ionique 5 mM NaCl et à pH 7,2. Les spectres ont été divisés en plusieurs gammes d'élution, selon le volume d'élution et les poids moléculaires des marqueurs utilisés (voir **Tableau.IV.5.**). $\beta'1$: fraction agrégée de β lg ; $G'1-4$: fractions des agrégats de Glob; $\beta G'1-3$: fractions des agrégats issu des mélanges β lg /Glob.

La **Figure.IV.17.** montre les profils d'élution de différentes dispersions protéiques dénaturées à 5 mM NaCl et pH 7,2. Les distributions des fractions protéiques des différents échantillons étudiés, obtenues par SEC-HPLC en fonction leurs poids moléculaires sont reportés dans le **Tableau.IV.5.**

Tableau.IV.5. Pourcentage relatif des aires des pics SEC-HPLC calculé par intégration correspondant aux fractions de protéiques obtenues dans les **Figures.IV.16.** et **IV.17.**

Echantillon	Fractions						
	Volume d'élution (Ve en ml)						
	Pourcentage relatif de la fraction protéique (surface de pic %)						
(a)	Poids moléculaires relatifs Mw (kDa)						
		660-443	443-43	43-29	29-13,7	< 13,7	
		G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	
	Glob	Ve	9,1 ± 3,4	10,6 ± 2,9	11,4 ± 2,10	12,3 ± 1,8	13,5 ± 1,3
		%	23 ± 1,6	35 ± 3,2	17 ± 1,1	14 ± 2,1	10 ± 1,3
βlg		-	-	β ₁	-	-	
	Ve	-	-	11,5 ± 2,1	-	-	
	%	-	-	100 ± 1,1	-	-	
(b)	Poids moléculaires relatifs Mw (kDa)						
		8000 >> Mw>600	600 >> Mw>75	75-29	< 13,7		
		G' ₁	G' ₂	G' ₃	G' ₄		
	Glob	Ve	8,6 ± 1,15	9,7 ± 1,8	11,1 ± 2,4	12,8± 0,6	
		%	11,9 ± 1,4 (a)	49,5 ± 2,2 (a)	30,4 ± 3,1 (a)	08,2± 1,6	
	βlg		β' ₁	-	-	-	
		Ve	7,7 ± 1,2				
		%	100 ± 2,7 (e)	*	*	*	
	mélanges βlg/Glob	Poids moléculaires relatifs Mw (kDa)					
			8000 > Mw>2000	2000 >> Mw>200	75-29		
		βG' ₁	βG' ₂	βG' ₃			
30/70		Ve	7,4± 1,8	9,7 ± 2,5	10,9 ± 1,6		
		%	47,5± 1,9 (b)	32,3 ± 2,3 (b)	20,2 ± 0,5 (b)		
50/50		Ve	7,5± 1,5	9,7 ± 1,2	10,8 ± 0,50		
		%	66,5± 2,3 (c)	20,1 ± 1,4 (c)	13,4 ± 0,9 (c)		
70/30		Ve	7,6 ± 2,7	9,7 ± 0,8	10,82 ± 2,3		
		%	78,2 ± 0,9 (d)	13,3± 2,5 (d)	8,5± 1,4 (d)		

Le chauffage des globulines de pois conduit à la formation d'agrégats avec un profil d'élution composé de 4 pics caractéristiques (G'_1 , G'_2 , G'_3 , G'_4) (**Figure.IV.17.**) montrant l'augmentation de la proportion relative des protéines participant à la formation d'agrégats (**Tableau.IV.5.**). La fraction G'_1 élué représente des agrégats de hauts poids moléculaires ($8000 \text{ kDa} > M_w > 600 \text{ kDa}$); G'_2 représente des fractions de M_w compris entre 75 et 600 kDa qui sont considérés comme des agrégats de taille intermédiaires; G'_3 et G'_4 pourraient être attribués à des sous-unités de globulines dissociées thermiquement, et non agrégées de $M_w \sim 13,9\text{-}75 \text{ kDa}$. Ce résultat est en accord avec les résultats de SDS-PAGE précédents qui mettent aussi en évidence la non-participation dans l'agrégation de certaines fractions et sous-unités de globulines dissociées thermiquement.

Les résultats obtenus étaient proches de ceux rapportés par **Mession, et al. (2013)**, concernant des agrégats solubles de globulines de pois; néanmoins ces auteurs ont indiqué que la première population avait une masse moléculaire $M_w > 700 \text{ kDa}$ ce qui est moins élevé que dans notre étude pour G'_1 (**Tableau.IV.5.**). Dans notre cas, il semble qu'une meilleure séparation et distribution de M_w des agrégats et des fractions protéiques ait été obtenue par rapport à celle de **Mession, et al. (2013)**.

Par contre, la masse molaire M_w des agrégats de Glob correspondant à G'_1 était proche des résultats obtenus par **Choi & Ma (2006)** pour les agrégats de globulines d'avoine, et aussi proche des résultats obtenus par **Fang, et al (2013)** ; **Li, et al. (2007)** pour des agrégats thermiques de protéines de soja. Ces derniers auteurs ont considéré que les gros agrégats thermiques de protéines de soja éluaient près du V_0 de la colonne de SEC-HPLC et de la colonne de filtration sur gel. L'estimation de la distribution des M_w des agrégats de globulines de soja était de $4 \text{ à } 8 \times 10^3 \text{ kDa}$ à une concentration protéique comprise entre 0.5% et 5%.

A la même concentration protéique pour Glob et pour βlg (2 % m/m), l'intensité du signal de G'_1 était faible par rapport à la quantité probable d'agrégats de hauts poids moléculaires formés. La même intensité pour la fraction de G'_1 a été obtenue pour un échantillon à une concentration de 4% de Glob (résultats non montrés). Nous avons constaté en effet que la filtration des échantillons à $0,45 \mu\text{m}$, avant l'injection dans la colonne SEC-HPLC provoque l'élimination de très gros agrégats de Glob (environ 50 % estimé par dosage de protéines par la méthode de Kjeldahl) (résultats non montrés).

Ces résultats sont cohérents avec notre hypothèse de la formation de macro-agrégats solubles et non sédimentables pour les agrégats thermiques de Glob (Cf. **Chapitre IV.4**). Ce phénomène n'a pas été observé pour les agrégats de β lg seule et la perte par insolubilisation a été limitée à 5 %. Ceci a aussi été confirmé par la quantification de la surface totale du chromatogramme pour les différents mélanges β lg/Glob qui a augmenté par rapport à la somme pondérée des zones chromatographiques associées aux systèmes de protéines pures. Ces augmentations ont été de l'ordre de 15%, 18% et 22% pour les rapports massiques β lg/Glob de 70/30, 50/50 et 30/70, respectivement. Ce résultat indique une diminution de la perte de matière protéique lors la filtration des mélanges β lg/Glob (filtres 0,45 μ m). Il est important de noter que ce phénomène de perte de la matière protéique lors de filtration a été décrit par **Schokker, et al. (1999)** pour les agrégats de β lg formés à un pH faible.

Les profils d'élution des agrégats mixtes pour différents ratios β lg/Glob, respectivement à 30/70, 50/50 et 70/30 (**Figure.IV.17.**) donnaient trois fractions principales notées $\beta G'_1$, $\beta G'_2$, $\beta G'_3$. Le V_e des fractions $\beta G'_1$ était proche du V_0 de la colonne à raison de $\sim 7,4 \pm 1,8$; $7,5 \pm 1,5$; $7,60 \pm 2,7$ ml respectivement pour les ratios β lg/Glob de 30/70, 50/50, 70/30. Par comparaison de ces fractions à celles formées lors de l'agrégation de Glob seule, on constate une augmentation du poids moléculaire des agrégats formés en présence de β lg ($\beta G'_1$), ainsi qu'une diminution de la proportion d'agrégats intermédiaires ($\beta G'_2$) et une diminution du taux de fractions protéiques dissociées thermiquement et non impliquées dans l'agrégation ($\beta G'_3$) (**Figure.IV.17.** et **Tableau.IV.5.**). La diminution de $\beta G'_2$ et $\beta G'_3$ peut être expliquée par l'incorporation simultanée de ces deux dernières fractions dans la formation des agrégats de plus hauts poids moléculaires et/ou des agrégats intermédiaires (**Tableau.IV.5**).

Par ailleurs, contrairement au cas de la Glob seule, la filtration des échantillons avant injection entraînerait une perte limitée de matière protéique (< 10%). D'après ces résultats, le poids moléculaires des agrégats de la fraction $\beta G'_1$ décroît en fonction de la proportion de la β lg dans les mélanges: $M_w (\beta G'_1)_{30/70} > M_w (\beta G'_1)_{50/50} > M_w (\beta G'_1)_{70/30} > M_w \beta'_1 > M_w G'_1$.

En comparant ces résultats obtenus en SEC-HPLC à ceux obtenus par la DLS, il semble qu'une plus forte proportion de β lg dans les mélanges entraînerait : (i) une moins grande hétérogénéité dans la distribution de taille des particules et une diminution du (D_h) moyen des particules agrégées, (ii) et une augmentation de la M_w des agrégats formés.

Comme discuté dans les parties précédentes, et en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature (**Mession, et al. 2015a; Mession, et al. 2013; Mori, et al. 1982; O'Kane, et al. 2005; Sun & Arntfield 2010**), la formation des agrégats solubles de globulines de légumineuse est gouvernée principalement par des interactions hydrophobes et aussi par des échanges de pont disulfures pour les sous-unités de légumine. Ceci donnerait lieu à la formation de macro-agrégats aléatoires et désordonnés correspondant à un D_h élevé et un poids moléculaire au-delà de 8000 kDa. Pour la β lg, les agrégats formés étaient de hauts poids moléculaires 8000 kDa $>M_w >> 2000$ kDa et semblaient posséder un D_h plus réduit et donc une structure plus compacte. On peut donc suggérer que la présence de β lg dans le mélange à faible concentration (ici $\sim 2\%$), contribue à la formation d'agrégats mixtes de hauts poids moléculaires plus compacts que dans le cas des agrégats de globulines seules. Ces agrégats mixtes compacts seraient structurés et stabilisés par des interactions non covalentes et surtout par des ponts covalents SS fournis par la β lg au cours de la dénaturation thermique simultanée des deux protéines.

Pour les agrégats préparés à une force de 100 mM NaCl, les résultats sont montrés dans la **Figure.IV.18**. Ces résultats peuvent être discutés de façon qualitative compte tenu de la perte considérable de matière protéique qui a été enregistrée lors de la préparation des agrégats soluble (après la centrifugation), comme il a été expliqué dans le **Chapitre IV.1**, mais aussi lors de la filtration (filtre $0,45\mu\text{m}$) des échantillons avant injection dans la colonne SEC-HPLC. Un autre facteur très important qui est responsable de ce phénomène de précipitation est celui de la concentration initiale (de 2%) utilisée dans cette étude, qui est proche de la concentration de gélification thermique à 100 mM NaCl pour la β lg (2,4% pour notre cas (Cf. **Chapitre III.2.8**)).

Les volumes d'élution obtenus ont été très proches du volume mort de la colonne (4,3 ml), ce qui indique que les agrégats ont un poids moléculaires plus élevé ($\sim 8 \times 10^6$ kDa) que ceux formés à 5 mM NaCl. Ce résultat est cohérent avec d'autres travaux décrits dans la littérature (**Hoffmann & van Mil 1999; Li, et al. 2007; Schmitt, et al. 2007**).

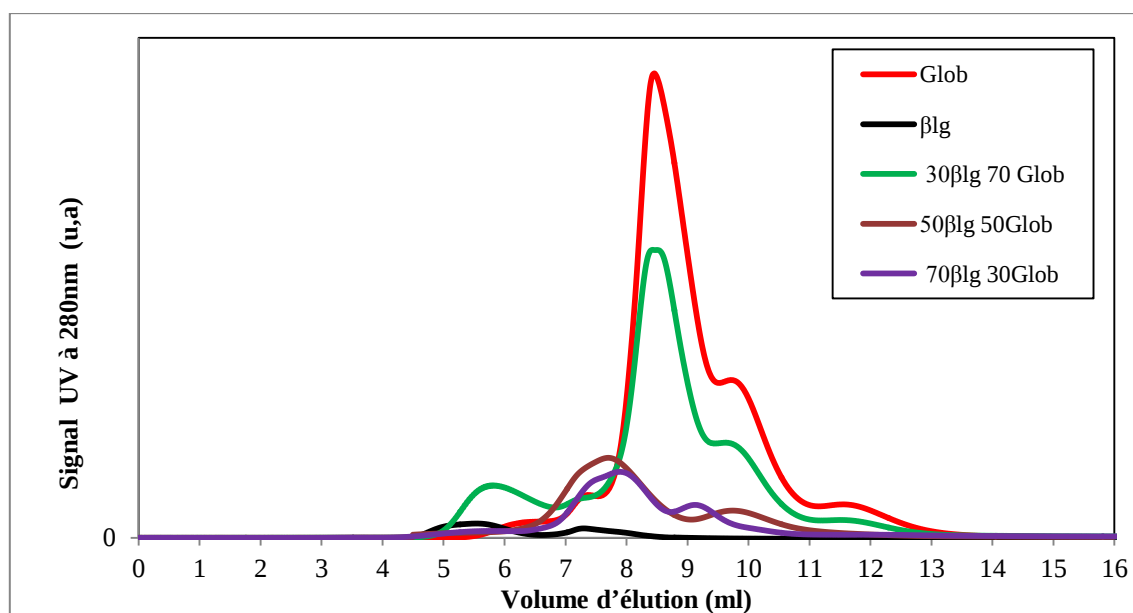


Figure.IV.18. Profils SEC-HPLC des agrégats de β lg, Glob et les mélanges (β lg/Glob) à différents ratios (30/70, 50/50, 70/30) préparés à (85 °C pendant 60 min) et à une concentration initiale de 2%, à une force ionique 100 mM NaCl et pH 7,2. La colonne a été calibrée dans les mêmes conditions que citées précédemment et au même débit d'élution 0,4 ml/ min.

Il a été constaté également que l'intensité relative des pics observés pour les mélanges, diminue en fonction de l'augmentation du ratio massique β lg/Glob. Ce résultat est contraire à celui révélé pour les agrégats formés à 5 mM NaCl, où l'intensité des pics avait augmenté en fonction de l'ajout de β lg dans les mélanges.

La diminution de l'intensité des pics correspond aux agrégats intermédiaires et peut être dû probablement à l'incorporation de ces fractions intermédiaires dans la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires sédimentable, qui vont être éliminés lors de la centrifugation et la filtration avant l'injection dans la colonne SEC-HPLC.

En rapprochant ces résultats de ceux de la DLS pour les échantillons à 100 mM NaCl, les données indiquent que les agrégats solubles formés sont de très grandes tailles (208 à 243 nm) et ont un poids moléculaire élevé ($\sim 8000 \times 10^3$ kDa, qui est proche du volume mort (V_0) de la colonne SEC-HPLC).

IV.9. Analyse SDS-PAGE des fractions agrégées à 5 mM NaCl

Afin de déterminer la nature des polypeptides qui composent les agrégats de différents poids moléculaires en fonction du ratio β lg/Glob dans les conditions 5 mM NaCl, les éluats correspondants aux différents pics (β G'₁, β G'₂, β G'₃) ont été collectés en sortie de colonne SEC-HPLC (La **Figure.IV.19.**) et analysés par SDS-PAGE. Compte tenu du faible volume d'échantillon injecté dans la colonne (100 μ l) et de la très faible quantité de protéines récupérées dans les fractions après élution, la composition des différents polypeptides qui composent les agrégats protéiques est commentée qualitativement.

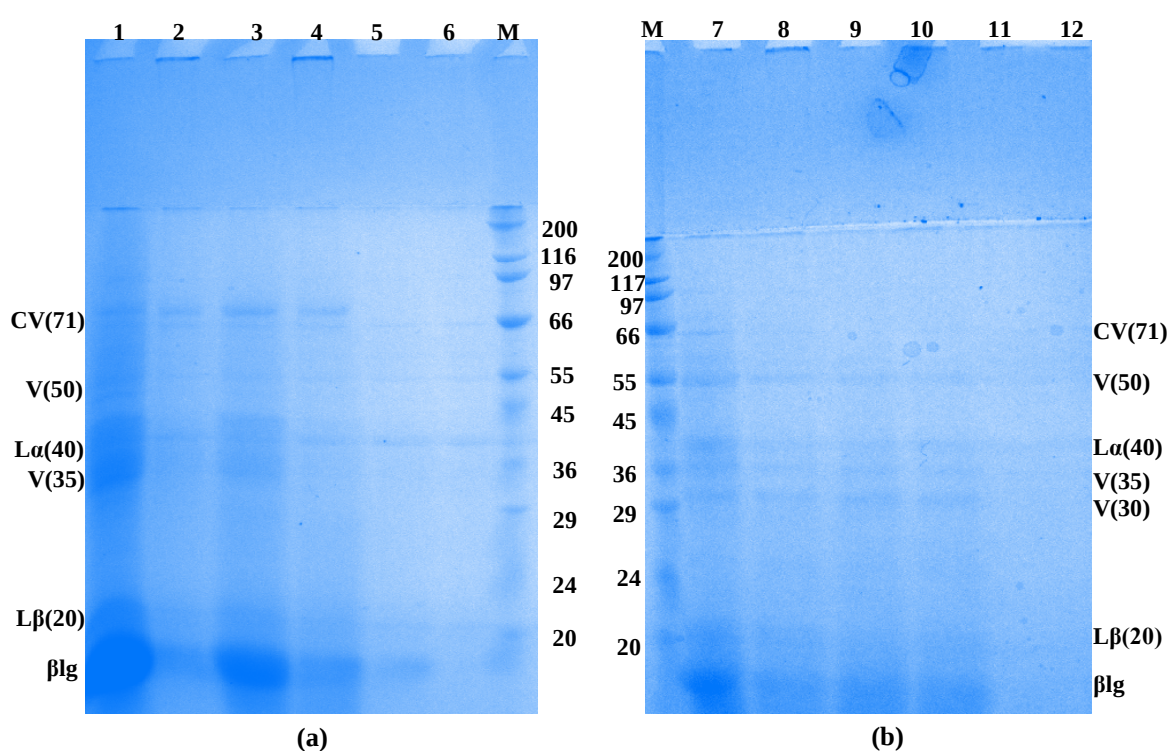


Figure.IV.19.: Profil SDS-PAGE en conditions non réductrices (CNR), conditions réductrices (CR) des fractions β G'₁, β G'₂, β G'₃ à différents ratios β lg/Glob respectivement 50/50 **(a)**, 70/30 **(b)** collecté par fractionnement SEC-HPLC à une force ionique de 5 mM en NaCl et pH 7,2. **(a):** ratio 50/50; Puits 1,2 β G'₁ en CR, CNR, Puits 3,4 β G'₂ en CR, CNR,; Puits 5,6 β G'₃ en CR, CNR. **(b):** ratio 70:30 ; Puits 7,8 β G'₁ en CR, CNR; Puits 9,10 β G'₂ en CR, CNR, Puits 11, 12 β G'₃ en CR, CNR,. M : Marqueurs de masse molaire (kDa); L α : polypeptide acide de la légumine; L β : Polypeptide basique de la légumine; V: Vicilines; CV: convicine; β lg: β -lactoglobuline; Glob: globuline.

La **Figure.IV.19.(a)** montre le profil SDS-PAGE des fractions protéiques correspondant aux pics d'agrégats $\beta G'_1$, $\beta G'_2$, $\beta G'_3$ pour le ratio $\beta lg/Glob$ de 50/50. Le profil de migration des polypeptides indique la présence de la βlg et des sous-unités de Glob dans toutes les fractions collectées ($\beta G'_1$, $\beta G'_2$, $\beta G'_3$) que ce soit en conditions réductrices ou non réductrices. Le profil de $\beta G'_1$ renforce donc l'hypothèse précédente sur la formation possible d'agrégats solubles mixtes impliquant le greffage covalent entre la βlg et certaines sous-unités de globuline.

Le profil de migration de $\beta G'_1$, $\beta G'_2$ montrent des dépôts d'agrégats de hauts poids moléculaire supérieurs à 200 kDa dans le gel de concentration (Puits 2, 4) ainsi que la migration de sous-unités de convicine, vicilines et de βlg avec une faible intensité pour cette dernière. Dans les conditions réductrices (puits 1,3), on constate la présence de toutes les sous-unités de Glob avec la dissociation de légumine en $L\alpha$, $L\beta$, et la présence de βlg en très forte intensité et la bande de convicine qui semble également bien présente. Ces résultats indiquent que les agrégats mixtes entre les sous-unités ont été formés principalement par des interactions covalentes impliquant des échanges de ponts disulfures entre βlg et/ou les sous-unités $L\alpha$, $L\beta$, et dans une moindre mesure avec les sous-unités de convicine.

Une diminution de l'intensité des bandes $L\alpha$, $L\beta$ et βlg dans la fraction $\beta G'_2$ a été remarquée par rapport à celle de $\beta G'_1$. Cela peut signifier qu'une grande partie de ces polypeptides ont été incorporés préférentiellement dans la fraction $\beta G'_1$.

Le profil de SDS-PAGE de la fraction $\beta G'_3$ donnait une migration similaire dans les conditions réductrices et non réductrices avec une intensité plus faible des bandes de vicilines, $L\alpha$, $L\beta$, et βlg ; l'absence de la bande de convicine est un indice de l'incorporation de cette dernière fraction dans les deux premières fractions ($\beta G'_1$ et $\beta G'_2$).

La **Figure.IV.19(b)** montre le profil SDS-PAGE des fractions protéiques qui correspond aux pics d'agrégats $\beta G'_1$, $\beta G'_2$, $\beta G'_3$ pour le ratio $\beta lg/Glob$ 70/30. Comme précédemment au ratio de 50/50, un dépôt d'agrégats dans le gel de concentration est observé dans les conditions non réductrices (puits 8,10). L'ajout de DTT (condition réductrice) permet de faire apparaître les sous-unités des $L\alpha$, $L\beta$ et βlg (puits 7); l'apparition de ces bandes était plus intense pour $\beta G'_1$ que pour $\beta G'_2$ (puits 9). Le profil de migration de la fraction $\beta G'_3$ donnait des intensités de bande très faibles par rapport à celles obtenues pour la même fraction collectée au ratio $\beta lg/Glob$ 50/50. Ces résultats sont en adéquation avec les valeurs

d'intensité du signal obtenu en SEC-HPLC pour les 3 types de pic (**Tableau.IV.5.**). L'ensemble de ces résultats montrent la formation d'agrégats mixtes entre les 2 types de protéines sous forme d'agrégats de hauts poids moléculaires $\beta G'_1$ et d'agrégats de taille intermédiaire $\beta G'_2$.

La formation des agrégats $\beta G'_1$ semblent gouvernés par la mise en jeu de liaisons covalentes et fait intervenir des interactions hydrophobes et des échanges de ponts disulfures entre les molécules βlg et/ou les sous-unités de légumine et/ou de convicine.

IV.9. Hypothèse de mécanisme d'agrégation des agrégats solubles mixtes

Sur la base des résultats précédents, nous proposons une hypothèse pour le mécanisme d'agrégation entre les deux protéines chauffées simultanément dans un milieu de faible force ionique. L'agrégation des protéines globulaires dépend de l'équilibre entre leur charge de surface et les interactions attractives hydrophobes après la dénaturation thermique de ces protéines (**Mession, et al. 2013; Mori, et al. 1982**).

A pH 7,2, les deux protéines sont chargées négativement, ce qui favorise la répulsion entre ces molécules. A pH neutre, la dénaturation thermique simultanée des deux protéines en mélange, provoque le déplissement de ces dernières par la perte de leur structure quaternaire et tertiaire et secondaire. Simultanément, l'exposition des groupements thiols libres contribue à l'échange de pont disulfure intermoléculaire entre les monomères de βlg et/ou principalement les sous-unités de légumine notamment de la fraction $L\alpha$ dissociée par le traitement thermique (**Mession, et al. 2015a; Mession, et al. 2013**).

Enfin, les oligomères mixtes formés réagiraient via des interactions non covalentes (hydrophobes et/ ou électrostatiques) avec les autres sous-unités de globuline de pois qui ne se sont pas agrégées (légumine, convicine, vicilines), ce qui donnerait majoritairement des agrégats solubles mixtes de hauts poids moléculaire avec un diamètre hydrodynamique plus compact (jusqu'à ~90-110 nm) que celui des agrégats formés de globulines seules (jusqu'à ~150 nm).

Les interactions covalentes, en particulier les échanges de pont disulfure dus à la présence de βlg , pendant la dénaturation thermique simultanée des deux protéines joueraient un rôle important dans la formation de ces agrégats plus denses. Une participation importante de certains polypeptides de globuline (légumine et convicine) par des liaisons covalentes a

également été observée dans les mélanges mixtes chauffés, donnant naissance à des agrégats maintenus par des interactions covalentes croisées entre les deux types de protéines.

Cette proposition de mécanisme d'agrégation et la formation d'agrégats mixtes « réticulés », n'exclue pas l'éventualité de la formation et la coexistence d'agrégats purs de chaque protéine avec des tailles similaires (**Figure.IV.20.**).

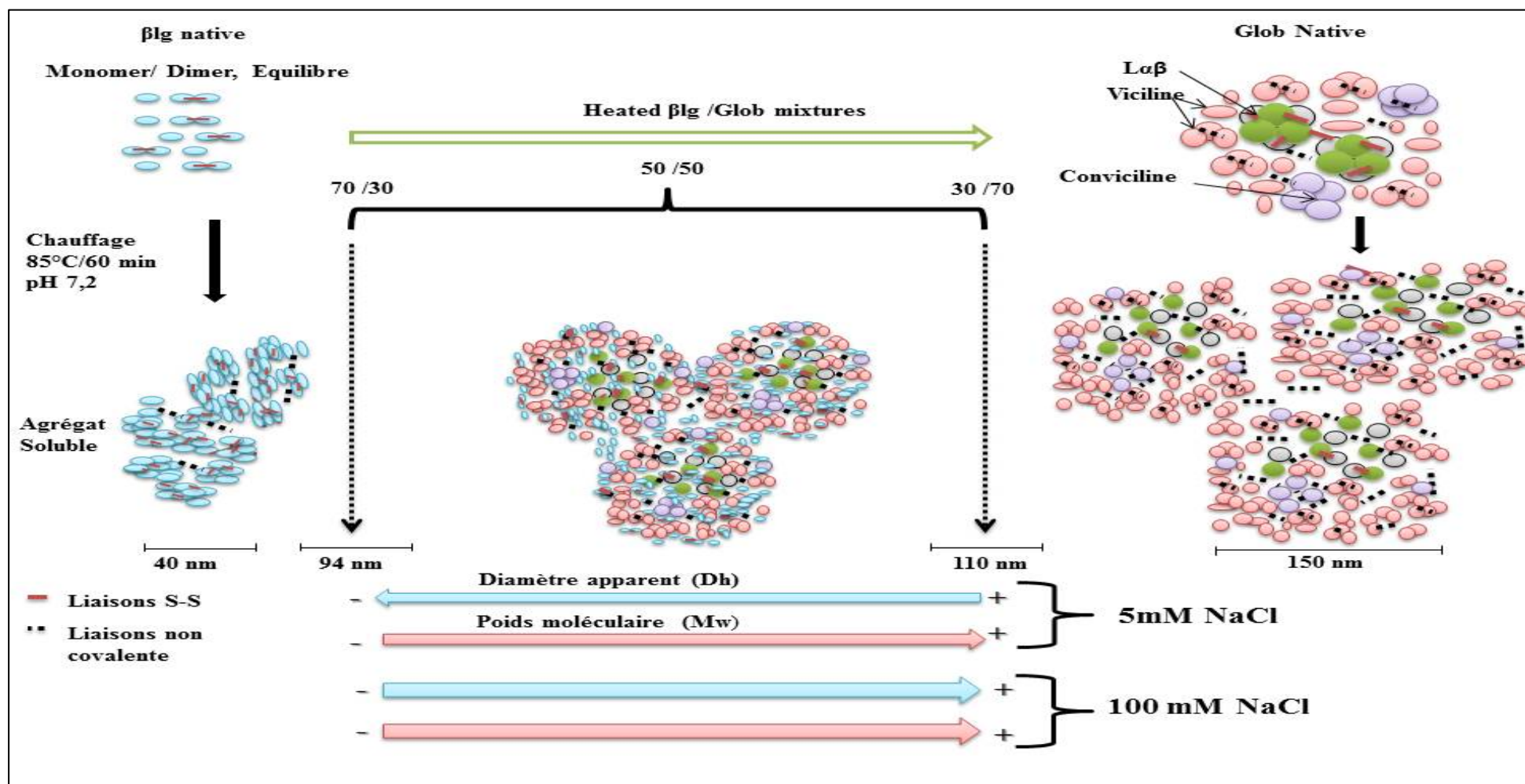


Figure.IV.20. Schéma du mécanisme d'agrégation des agrégats solubles mixtes à 5 et 100 mM NaCl

VI.10. Conclusion du chapitre

Dans les conditions expérimentales étudiées (pH, concentration protéique, force ionique, température de dénaturation, concentration protéique), les agrégats de Glob correspondent à des macro-agrégats non sédimentables particulièrement à 5 mM en NaCl. Le mécanisme d'agrégation de ces derniers est géré très majoritairement par des liaisons non covalentes (hydrophobes).

Pour les deux forces ioniques étudiées, le résultat de l'agrégation de Glob en présence de β lg, montrent que des agrégats mixtes ont été formés en faisant intervenir des échanges de liaisons disulfures et /ou des interactions non covalentes.

A 5 mM notamment, une participation intense de certains polypeptides de globuline notamment légumine $\text{L}\alpha$ (40 kDa) et en moindre mesure la convicine (71 kDa), par des liaisons covalentes a été observée dans les mélanges chauffés, donnant naissance à des agrégats formés par des interactions covalentes croisées entre les deux types de protéines.

A 5 mM en NaCl, les liaisons disulfures issues de la β lg contribuent surtout à la formation d'agrégats mixtes denses (majoritaires) et des agrégats intermédiaires (minoritaires) avec un diamètre réduit par rapport à celui obtenu pour les macro-agrégats de Glob. De même, l'augmentation de l'apport massique de β lg dans les mélanges entraîne une augmentation des interactions non covalentes dans les mélanges, conduisant à l'incorporation des sous-unités dissociées de Glob, afin de former des agrégats intermédiaires de poids moléculaires plus important que ceux formés pour les agrégats solubles de Glob seule.

Ce mécanisme d'agrégation et la formation d'agrégats mixtes n'exclue pas l'éventualité de la formation et la coexistence d'agrégats purs de chaque protéine avec des tailles similaires.

La formation des agrégats mixtes à 100 mM NaCl ne présente pas une bonne alternative pour la suite de nos travaux au vu de la taille et le poids moléculaire des agrégats formés, ainsi que de la quantité de matière protéique perdue lors de la récupération des agrégats solubles. En effet pour préserver la quantité maximale de protéines dénaturées en mélange, l'utilisation d'une faible force ionique est préférable dans la suite de nos travaux de gélification.

Chapitre V : Gélification à froid des agrégats solubles.

Dans le chapitre précédent (**Chapitre IV**), nous avons établi l'hypothèse du greffage covalent entre la β -lactoglobuline et certaines sous-unités de globuline de pois, lors de la thermodénaturation de ces deux protéines en mélange. Ce greffage covalent entre les sous-unités de légumine de pois et de β lg conduit à une modification de la qualité méso-structurale des agrégats solubles formés (la taille et poids moléculaire). Dans des conditions de faible force ionique (5 mM NaCl), ces agrégats mixtes sont caractérisés par un poids moléculaire faible et une structure plus compacte par rapport à ce qui est observé pour la Glob seule.

Dans ce contexte, nous allons utiliser les agrégats étudiés précédemment afin d'élaborer des gels acides dits « à froid » par l'ajout de GDL à différentes concentrations protéiques. La présente étude vise à étudier (i) le profil de gélification des agrégats préparés, soit à partir des agrégats seuls de β lg et Glob (témoins), soit à partir de mélanges de ces deux types d'agrégats préparés séparément (que nous désignerons par la suite par « **mélanges d'agrégats** », soit encore à partir d'agrégats thermiques issus du chauffage simultané des deux protéines natives (que nous désignerons ultérieurement par « **agrégats mixtes** ») ; (ii) les propriétés mécaniques des gels formés et (iii) leur microstructure. Les suspensions d'agrégats protéiques ont été préparées dans les mêmes conditions de chauffage et de pH que précédemment, (Cf. **Chapitre IV**) et à une force ionique de 5 mM NaCl.

V.I. Détermination du diagramme d'état sol/gel, et des concentrations minimales de gélification thermique ($C_{g_{th}}$) des mélanges β lg/Glob.

La formation des agrégats protéiques et la gélification du système protéique ne se font qu'après la dénaturation thermique des protéines. Cette dénaturation modifie l'environnement des protéines et affecte leur structure conduisant au déplissement des protéines. Il en résulte une exposition des groupements thiols et des sites hydrophobes des polypeptides. L'émergence de différentes interactions de types électrostatiques, physiques non spécifiques (hydrophobe, hydrogène...) et/ou chimiques spécifiques (formation et/ou échanges de ponts disulfures) mènera à la formation d'agrégats protéiques, qui au-delà d'une concentration seuil, ou concentration minimale de gélification thermique ($C_{g_{th}}$), peuvent s'agglomérer en un réseau structuré.

Avant d'entamer la phase de gélification acide, il a été nécessaire de déterminer la concentration minimale de gélification thermique $C_{g_{th}}$ des mélanges protéiques β lg/Glob. Cette étape est essentielle car elle nous permettra de produire des agrégats mixtes en dessous

de $C_{g_{th}}$, et d'éviter la perte de matière protéique lors de la centrifugation des suspensions. Nous avons déterminé précédemment (Cf. **Chapitre III**) la concentration de gélification thermique de chaque protéines β lg et Glob, les valeurs obtenues étaient respectivement de 5% et 7% (**voir Annexe, Figure.1**).

Pour déterminer la $C_{g_{th}}$ des mélanges protéiques β lg /Glob, nous avons thermisé simultanément une série de mélanges protéiques à différentes concentrations dans les conditions opératoires citées précédemment. Les résultats du changement d'état des différents mélanges protéiques après refroidissement sont présentés dans la **Figure.V.1**.

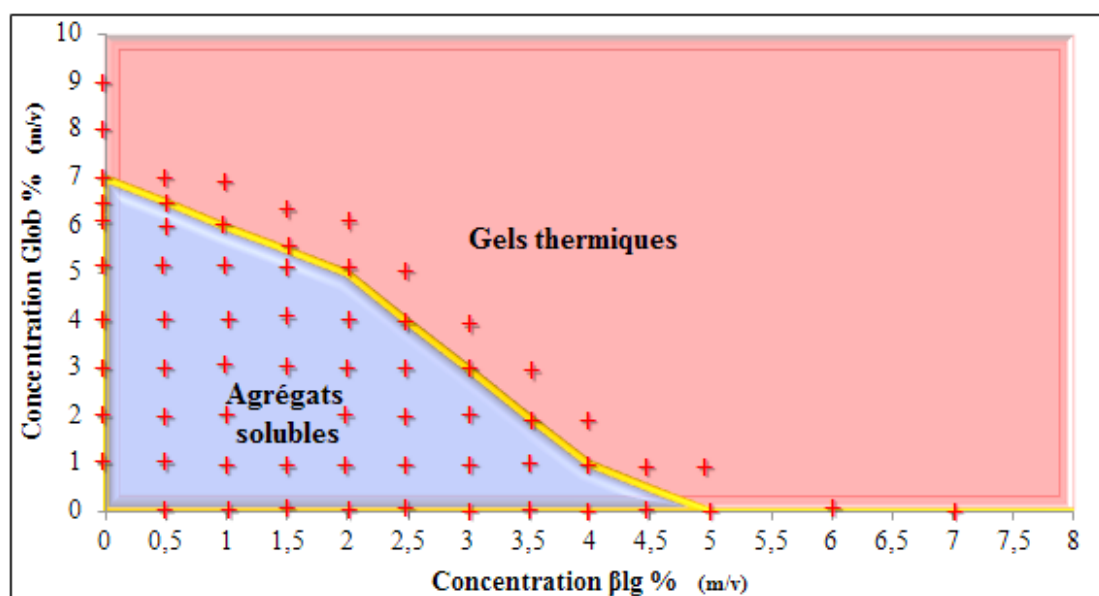


Figure.V.1. Diagramme d'état sol/gel thermique des solutions protéiques β lg/Glob dénaturées à 85° C pendant 60 min en mélange à pH 7,2, et à 5 mM NaCl.

La courbe limite qui représente la $C_{g_{th}}$ a été obtenue après retournement des tubes contenant les solutions protéiques mixtes. L'observation visuelle a permis de définir le domaine des gels thermiques et celui des agrégats solubles. Dans le domaine associé aux agrégats solubles, la centrifugation des mélanges thermisés ne donnait qu'un dépôt négligeable de matière protéique sous forme de culot. Ces données seront utilisées ultérieurement dans notre étude pour définir les conditions de formation des gels acides.

Il est important de noter que les mélanges (β lg/Glob) utilisés dans notre étude, n'ont pas montré de signe de séparation de phase macroscopique à l'état natif des protéines. Cela se traduit par l'absence de précipité lors de la préparation des échantillons. Il a été indiqué dans la littérature que les protéines globulaires possèdent des caractéristiques spécifiques. Ces

protéines globulaires sont compatibles et co-solubles avec la plupart des protéines globulaires appartenant à la même classe d'Osborne (Tolstoguzov 1999).

V.2. Détermination de diagramme d'état sol/gel acide et des concentrations minimales de gélification (C_{g_a}) des mélanges β lg/Glob

Contrairement à la gélification thermique des protéines, qui nécessite une concentration protéique élevée (en dessus de $C_{g_{th}}$), la concentration protéique utilisée dans l'élaboration des gels à froid doit être inférieure à $C_{g_{th}}$ (Bryant & McClements 1998). Afin d'élaborer des gels acides à température ambiante, le GDL a été ajouté sous forme de poudre dans les solutions d'agrégats de β lg, Glob et des mélanges protéiques à différents ratios massiques β lg/Glob. La quantité totale de GDL ajoutée dépend de la concentration de protéine suivant la formule : $\% \text{ GDL (m/m)} = 0,0065 * (\% \text{ Protéine}) + 0,045$, selon la méthode de (Munialo, et al. 2014). Le GDL a été ajouté avec des concentrations différentes allant de 0,4% à 0,97% (m/m) pour atteindre un pH de l'ordre de 4-5 après 24 h d'incubation à la température ambiante. Lors de l'acidification d'une solution protéique, l'hydrolyse de GDL libère des protons qui vont réduire par la suite les répulsions électrostatiques dans le système, engendrant un rapprochement des agrégats protéiques pour former un réseau macromoléculaire tridimensionnel (Alting, et al. 2003a; Bryant & McClements 1998).

Les valeurs des concentrations minimales de gélification acide (C_{g_a}) pour les solutions pures de β lg et de Glob sont présentées dans la Figure.V.2.

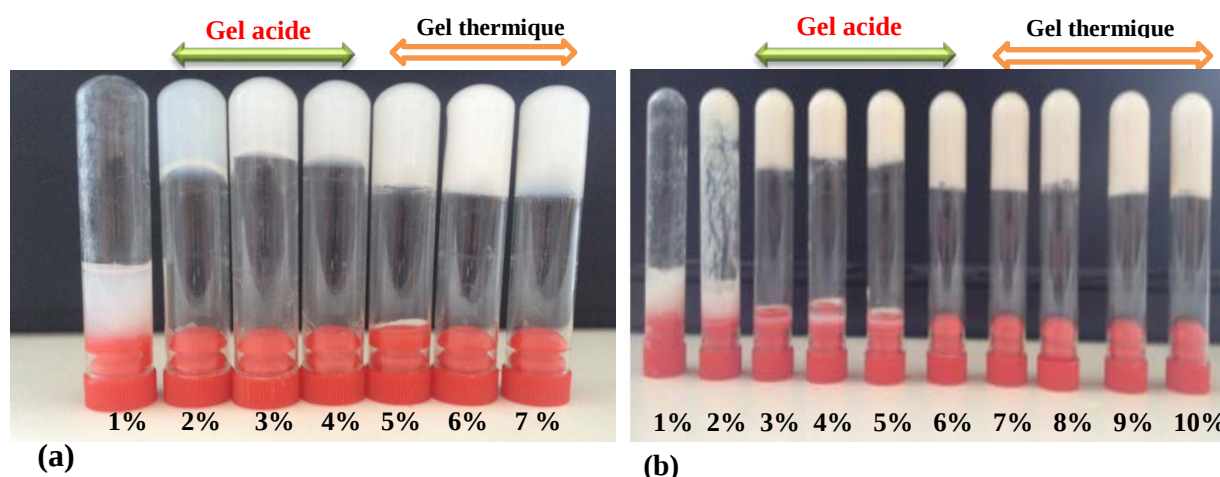


Figure.V.2. Concentration minimale de gélification acide C_{g_a} des agrégats de (a) :100% β lg; (b) :100% Glob après 24 h d'incubation à 25°C.

Les résultats de gélification par voie acide montrent que la formation du réseau tridimensionnel apparaît à partir d'une concentration de 2% pour β lg, et 3% pour Glob. En dessous de ces concentrations, la gélification des solutions protéiques n'est pas possible du fait d'une quantité insuffisante de protéines dans les milieux. Ces résultats sont proches de ceux rapportés dans la littérature concernant la gélification acide des isolats de protéines de lactosérum et de globulines de pois (**Alting, et al. 2003a; Messian, et al. 2015**).

La **Figure.V.2.** présente également l'aspect des gels acides obtenus. Celui-ci change progressivement d'un milieu translucide (avant acidification) à opaque (après gélification) quand le pH s'approche du pI pour les échantillons de β lg. Pour la globuline de pois, tous les échantillons gélifiés donnaient une couleur brune claire. Il a été indiqué dans la littérature, que l'aspect visuel des gels de protéines globulaires dépend de la force des interactions électrostatiques entre les protéines ; donc le système devient opaque soit par l'augmentation de la force ionique ou lorsque le pH atteint le pI des protéines dissoutes dans ce système (**Bryant & McClements 1998**). Comme précédemment, la détermination des concentrations minimales de gélification acide a été réalisée sur les mélanges chauffés de β lg/Glob (concentrations en dessous de $C_{g_{th}}$) en adaptant la quantité de GDL à la concentration initiale d'agrégats. Un diagramme sol/gel-acide a été établi et est présenté dans la **Figure.V.3**.

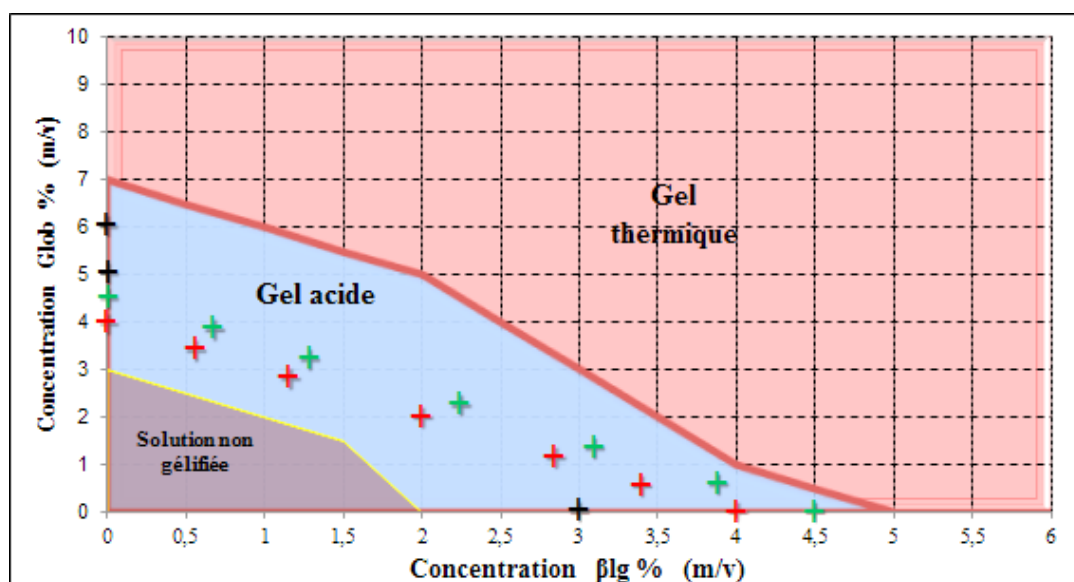


Figure.V.3. Diagramme d'état sol/gel-acide après l'ajout de GDL pour les systèmes d'agrégats mixtes solubles de β lg/Glob à une température de 25 °C. Les points présentés dans le diagramme correspondent aux différents mélanges de concentrations protéiques 4 et 4,5%

choisis pour l'étude rhéologique des gels mixtes acides, ainsi pour la β lg (à 2, 3 et 4%) et Glob (à 3, 4, 5 et 6%).

Le comportement des mélanges β lg/Glob vis-à-vis de la gélification est montré dans la **Figure.V.2.** et la **Figure.V.3.** Celles-ci permettent de distinguer trois zones différentes: **(i)** zone de gélification thermique, **(ii)** zone de gélification acide dans laquelle nous avons pu produire des agrégats protéiques solubles permettant la formation des gels acides, et **(iii)** zone de non gélification. Pour les agrégats mixtes qui n'ont pas gélifié, l'acidification de ces systèmes provoque un rapprochement des agrégats, ce qui conduit à la formation d'amas protéiques qui tendraient à précipiter au lieu de former un réseau de gel continu.

Il est important de signaler que les systèmes protéiques (β lg/Glob) préparés à base de mélanges d'agrégats de β lg et Glob obtenus séparément donnaient un diagramme d'état sol/gel-acide (même observation macroscopique) similaire après acidification par le GDL. Ceci indique clairement que, quelque soit le mode de préparation des agrégats solubles (chauffage simultané ou séparé) la formation des gels acides est dépendante de la concentration protéique initiale.

V.3. Propriétés de gélification à froid des agrégats protéiques

V.3.1. Cinétique de gélification à froid des agrégats protéiques

Les travaux présentés ci-dessus ont permis de définir le domaine qui va être utilisé pour la suite de notre étude. Il s'agissait de travailler dans le domaine éloigné des concentrations minimales de gélification thermique et acide (en dessous de $C_{g_{th}}$ et au-dessus de C_{g_a}). Afin de contrôler la cinétique de gélification du mélange d'agrégats protéiques, des études préliminaires ont été effectuées sur la cinétique d'acidification de chaque protéine (β lg et Glob) séparément.

V.3.1.1. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et Glob seuls

L'acidification des systèmes protéiques devait être relativement lente, afin d'éviter une sur-agrégation protéique préjudiciable à la tenue du gel en termes notamment de propriétés mécaniques du gel (capacité de rétention d'eau, force de gel...). Il a été signalé dans la littérature que l'augmentation de la quantité de glucono- δ -lactone (GDL) conduit à l'augmentation de l'instabilité du système. L'hydrolyse du GDL entraîne la diminution de pH

jusqu'à ce que le système atteigne un pH d'équilibre (**Cavallieri, et al. 2007; Cavallieri & da Cunha 2008**).

Le comportement d'acidification des agrégats solubles de β lg et de Glob à différentes concentrations est présenté dans le **Figure.V.4a,b**. L'ajout de GDL (0,4%-0,97%) est effectué en fonction de la concentration des agrégats de protéine. Le processus d'acidification commence par l'hydrolyse du GDL en acide gluconique suivi d'une libération des protons entraînant une réduction progressive des répulsions électrostatiques entre les protéines agrégées par protonation des groupements carboxyles (**Alting, et al. 2003a**). Ceci se traduit par une très forte diminution de pH pendant la première heure pour les deux protéines, suivie d'une diminution moins rapide de pH au cours des 6 heures suivantes pour la β lg (4%) et 3 heures pour la Glob (4%).

Après cette étape, la valeur du pH diminue lentement jusqu'à ce qu'elle se stabilise après 16 heures d'incubation. Cela est dû à l'établissement d'un état d'équilibre entre l'acide gluconique et la GDL. L'acidification des agrégats de β lg au cours de la première heure était plus lente par rapport à celle de la Glob; la β lg perd $1,35 \pm 0,2$ unité de pH avec une vitesse d'acidification de $0,022 \pm 0,1$ unité de pH.mn⁻¹. Dans le même temps, les agrégats de Glob perdaient $1,62 \pm 0,2$ unité de pH avec une vitesse de $0,027 \pm 0,2$ unité de pH mn⁻¹. Pour les deux types d'agrégats (β lg, Glob), la vitesse d'acidification dépend de la concentration initiale des protéines (**Alting, et al. 2003a; Li, et al. 2011**). Après 24 heures d'incubation, les valeurs de pH se stabilisent pour atteindre un pH de $3,98 \pm 0,2$, et $4,02 \pm 0,1$ respectivement pour β lg et Glob.

L'abaissement plus rapide de pH lors de l'acidification de Glob est peut-être dû à la diversité de pI des sous-unités polypeptidiques qui composent cette protéine (**O'Kane, et al. 2005**).

Du fait de l'hétérogénéité de pI des systèmes étudiés (pI 5,2, et 4,8 pour la β lg et Glob respectivement), nous avons veillé à ce que la quantité de GDL ajoutée dans les différents systèmes soit suffisante pour atteindre le pH d'équilibre et que le pH final du système ne soit pas inférieur à ~3,8 pour éviter l'effondrement du gel (transition de gel-sol) (**Alting, et al. 2002; Messian, et al. 2012**).

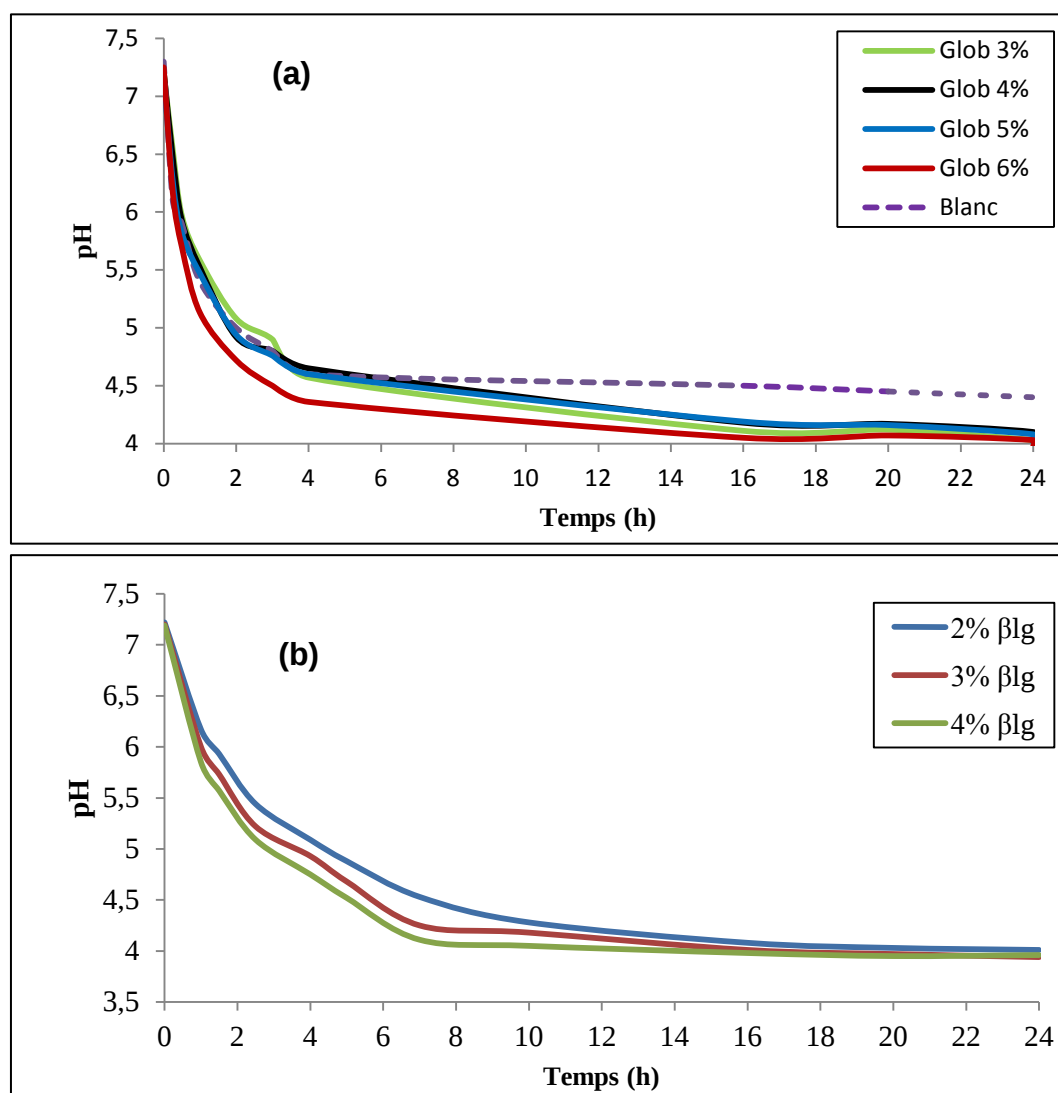


Figure.V.4. Cinétique d'acidification des agrégats solubles à différentes concentrations protéiques par ajout de GDL (0,4%-0,97%) en fonction du temps d'incubation (24 heures) à une température de 25 °C. (a): Glob ;(b) : βlg. le Blanc représente le profil de d'acidification de GDL dans l'eau.

V.3.1.2. Cinétique d'acidification des systèmes d'agrégats βlg/Glob.

A partir des digrammes de gélification des agrégats de βlg, Glob et de leurs mélanges, nous avons retenu les concentrations protéiques de 4% et 4,5% (m/m). Ce choix est justifié par l'éloignement de ces valeurs des seuils de concentration C_{ga} et C_{gh} et par la possibilité de faire varier le ratio βlg/Glob à l'intérieur de ce domaine.

Des mélanges ont donc été préparés, à différents ratios, afin de pouvoir déterminer l'effet de la βlg dans le mélange βlg/Glob dans la formation des gels. Des solutions d'agrégats

protéiques de β lg, de Glob et d'agrégats mixtes à différents ratios β lg/Glob (30/70, 50/50, 70/30) ont été acidifiées suivant le protocole décrit précédemment. Les profils d'acidification sont représentés dans la **Figure.V.5**.

L'acidification par l'ajout de la même concentration de GDL (0,68%) dans les solutions protéiques dénaturées conduit à la diminution de pH de façon régulière pour les agrégats de β lg et Glob, comme il a été discuté dans la partie précédente. Le pH des mélanges diminue rapidement au cours de la première heure et perd $1,6 \pm 0,2$, $1,53 \pm 0,1$, $1,4 \pm 0,1$ unités de pH respectivement pour les ratios 70/30, 50/50, 30/70. Une diminution lente de pH est observée jusqu'à 8 heures, où les valeurs de pH sont proches du pKa de l'acide glutamique / glutamate (pH =4,5) ; ensuite, le pH diminuait très lentement pour se stabiliser à des valeurs de pH de $\sim 4,15 \pm 0,3$ et $4,07 \pm 0,2$ après 16 heures d'incubation, et de $\sim 4,05 \pm 0,1$ et $4,1 \pm 0,1$ après 24 heures d'incubation. D'après ces résultats, nous avons constaté que le profil d'acidification des différents systèmes d'agrégats mixtes (β lg/Glob) a donné un profil proche de celui des agrégats majoritaires, ce qui signifie que l'acidification des mélanges est gouvernée par la protéine majoritaire du mélange.

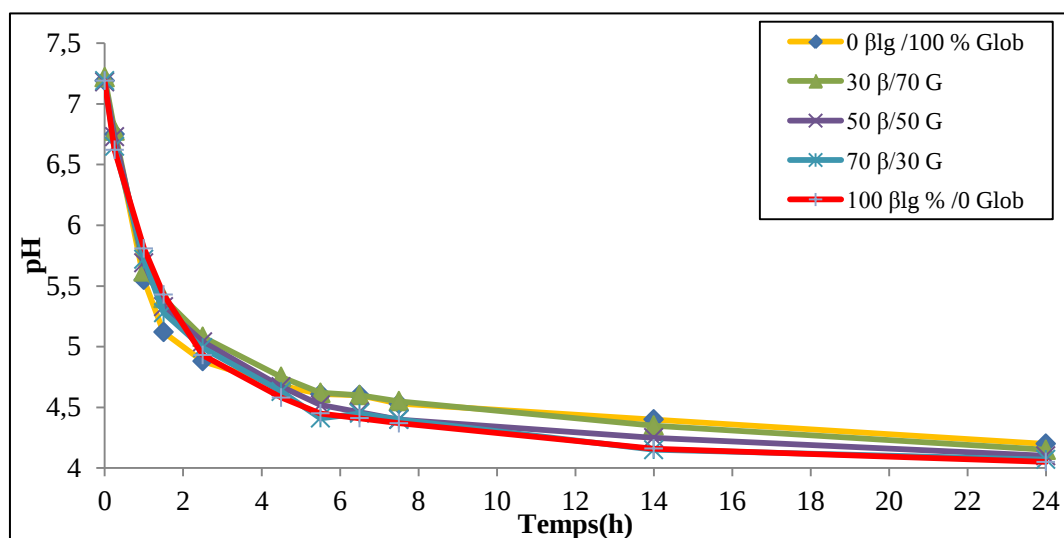


Figure.V.5. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob à 4% (m/m) et des agrégats mixtes à différents ratios β lg/Glob de 30/70; 50/50; 70/30. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0,68%) et suivie en fonction du temps d'incubation (24 heures) à une température de 25 °C.

Les cinétiques d'acidification ont également été évaluées pour des mélanges d'agrégats à différents ratios préparés après la dénaturation thermique séparée de β lg et de

Glob, avec les mêmes concentrations de protéine et de GDL. Les résultats sont présentés dans la **Figure.V.6**.

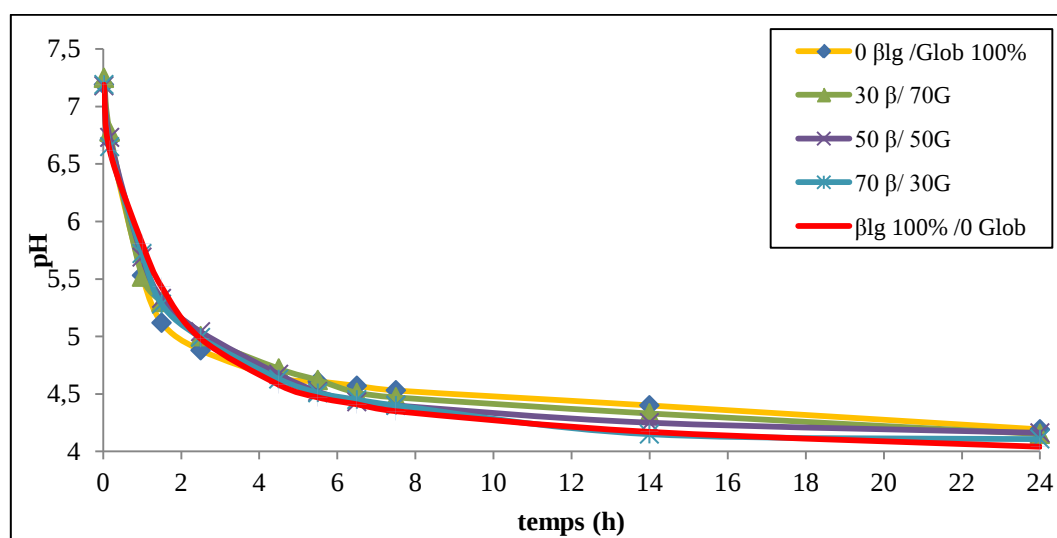


Figure.V.6. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob 4% (m/m) et des mélanges d'agrégats des deux protéines obtenus séparément à différents ratios β lg/Glob respectivement de 30/70, 50/50 et 70/30. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0,68%) et suivie en fonction du temps d'incubation (24 heures) à 25 °C.

Les résultats montrés dans la **Figure.V.6**. indiquent une similitude de comportement d'acidification entre les mélanges d'agrégats et les agrégats mixtes.

A une concentration protéique des mélanges β lg/Glob de 4,5% (une concentration au-dessous de C_{gth} de β lg) (**Annexe, Figure.2**), il a été constaté également que le profil d'acidification des mélanges protéiques obtenu pour les deux modes de préparation des mélanges est identique.

V.3.2. Rhéologie dynamique à faible déformation des gels acides

Afin de visualiser l'effet de la concentration de β lg sur la formation des gels acides mixtes (β lg/Glob), nous avons effectué des études rhéologiques oscillatoires à faible amplitude. Cette étude, nous permet de suivre la cinétique de gélification et d'évaluer les propriétés mécaniques des gels mixtes, ainsi que leur évolution en fonction du temps, du pH, et des concentrations protéiques retenues (de 4 et 4,5%) pour différents ratios β lg/Glob.

V.3.2.1. Rhéologie des gels acides de β lg et de Glob seuls

Avant d'entamer les propriétés rhéologiques des gels mixtes, il était intéressant d'étudier le comportement de gélification des agrégats seuls (β lg et Glob) qui ont été formés et caractérisés précédemment (Cf. **Chapitre III**, **Chapitre IV**), et de mettre en évidence l'impact de leurs caractéristiques sur la force de gels à froid de β lg et de Glob.

La **Figure.V.7.** montre l'évolution des modules de conservation G' au cours de l'acidification des agrégats de β lg pendant 10 heures, à différentes concentrations (au-dessous de $C_{g_{th}}$). Afin de mieux visualiser l'évolution de G' durant la gélification, les valeurs de temps d'incubation ont été converties en pH. Seuls les résultats de G' sont présentés car le module élastique est dominant (**Annexe, Figure.3**). Il a été constaté une augmentation de G' avec l'augmentation de la concentration de β lg. Ces résultats sont très proches de ceux rapportés dans la littérature (**Alting, et al. 2003a**).

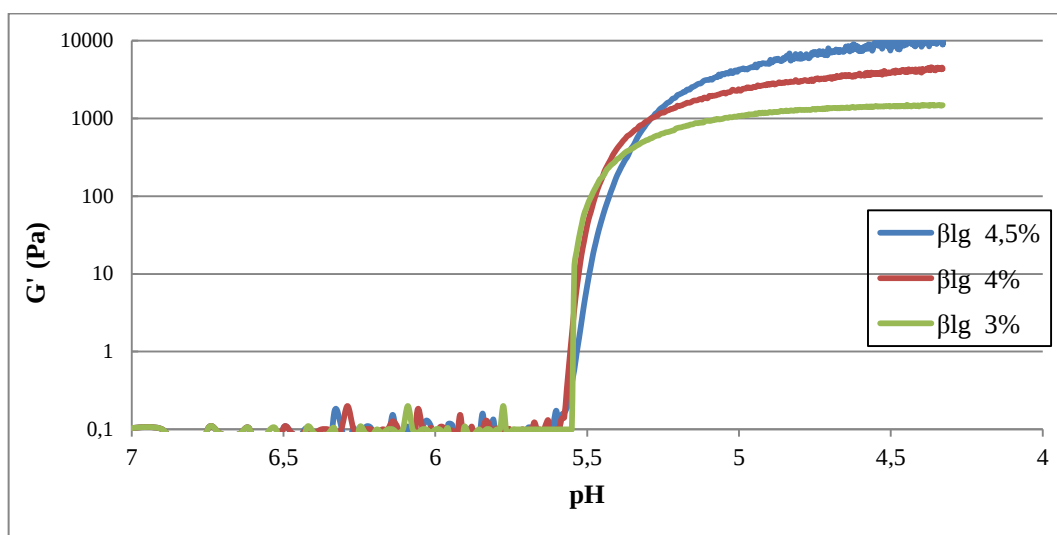


Figure.V.7. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH des agrégats de β lg à différentes concentrations protéiques respectivement de 3%, 4%, 4,5% incubés en présence de GDL, à 25 °C pendant 10 heures.

La **Figure.V.8.** montre l'évolution des modules de conservation G' au cours de l'acidification des agrégats de Glob (pendant 10 heures) en fonction du pH à différentes concentrations.

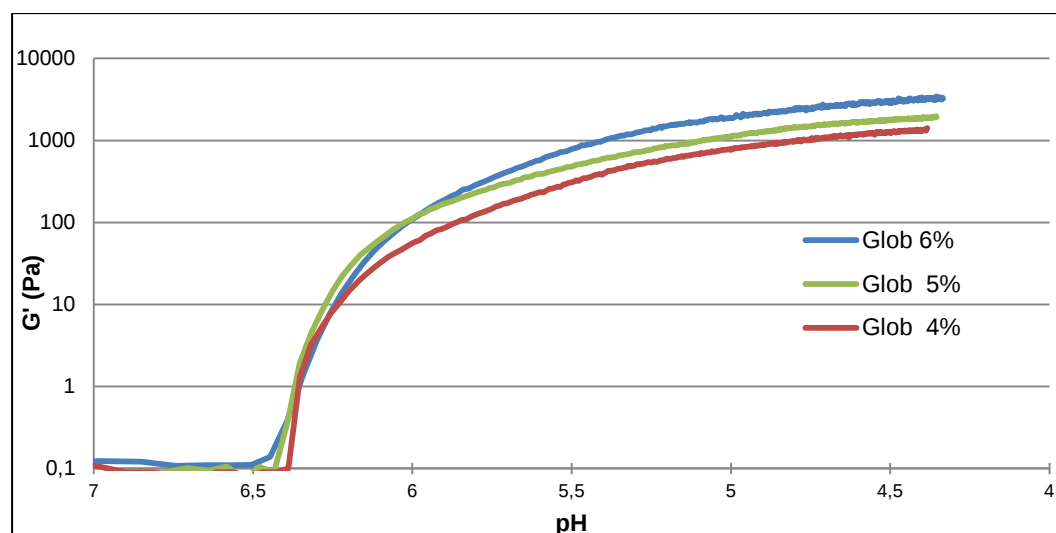


Figure.V.8. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH des agrégats de Glob à différentes concentrations protéiques respectivement de 4%, 5% et 6% incubés en présence de GDL, à 25 °C pendant 10 heures.

Le résultat présenté dans la **Figure.V.8.**, montre que la gélification acide des agrégats de Glob conduit à des valeurs de G' inférieures à celles obtenues pour les agrégats de β lg. Le module d'élasticité et le module de viscosité sont développés simultanément avec le temps et le pH, et le module G' est dominant (**Annexe, Figure.4**).

Notre résultat expérimental montre qu'à la même concentration protéique de Glob (4%), le module d'élasticité G' était ~ 2 fois plus grand que celui obtenu par **Mession, et al (2015)** dans des conditions opératoires très proches. Il semble que cette différence est due à la perte de certaines fractions de viciline lors de l'extraction des Glob, car les auteurs cités ci-dessus ont utilisés une cassette d'ultrafiltration de 100 kDa pour la concentration/purification des extraits protéiques, contre une cassette de 10 kDa utilisée dans notre étude.

Comme il est montré dans la **Figure.V.8.**, le module d'élasticité G' peut atteindre ~ 3300 Pa pour une concentration de 6% de Glob, cela signifie que cette protéine représente un bon substrat pour la gélification acide.

Plusieurs différences peuvent être constatées par comparaison des gels de β lg et des gels de Glob. Les mesures sont résumées dans le **Tableau.V.1**.

Tableau.V.1. Propriétés de gélification acides des agrégats de β lg, Glob préparées à différentes concentrations protéiques, en présence de GDL à 25 °C.

Echantillons % (m/m)	P _{gel} (tang δ =1) (min)	pH correspondant	G' final (Pa) Après 10 h incubation	tang δ _{final}	
βlg	3	48.5± 1,4	5.57± 0,3	1469± 9.5	0.14± 0,1
	4	48± 3,9	5.64± 0,2	4559± 11,1	0.12± 0,01
	4,5	47.9± 1,1	5.64± 0,5	10035± 21	0.11± 0
Glob	4	14± 0,2	6,40± 0,1	1326± 9,7	0,22± 0,01
	5	13.5± 0,1	6.42± 0,1	1921± 10,1	0,21± 0,01
	6	13.1± 0, 2	6.45± 0,2	3279± 9,4	0,17± 0,01

Le point de transition sol-gel (P_{gel}) ou point de gélification des Glob est inférieur à celui de la β lg. Ces résultats ont été évalués par l'estimation du temps P_{gel} correspondant au moment du croisement de G' et G'' (**Annexe, Figure.5**) et, par corrélation, au pH atteint à ce croisement. Le point de transition sol-gel (P_{gel}) de β lg est estimé à un pH de 5,6 (~48 minutes), tandis que le P_{gel} de Glob est à un pH de ~6,4 (~14 minutes), donc ce dernier est atteint à un temps très inférieur à celui de β lg.

À partir du P_{gel} des différents systèmes protéiques, une rapide augmentation de G' a été observée jusqu'à atteindre un plateau après ~6 heures pour β lg, et ~4h pour Glob avec un pH final de 4,2-4,4 pour l'ensemble des gels. L'augmentation de G' traduit l'augmentation de l'élasticité des gels due au rapprochement des agrégats dans le domaine proche du pI, ce qui augmente les interactions intermoléculaires entre les protéines. Il a été rapporté dans la littérature que la formation du réseau de gel de β lg et de protéines de lactosérum est dominé par des interactions physiques, suivie par des interactions chimiques (liaisons covalentes) (**Alting, et al. 2003a; Alting, et al. 2003b**). Dans notre étude, il a été constaté qu'à la même concentration protéique de 4%, la force des gels de β lg atteint ~4600 Pa. Celle-ci est ~2,5 fois plus grande que celle des gels de Glob. Cette différence peut être attribuée à la composition et aux propriétés physico-chimiques de chaque type d'agrégat (taille, charge, hydrophobie de surface...).

Afin d'étudier les propriétés mécaniques des différents gels formés, un test de balayage de fréquence a été appliqué. Les spectres mécaniques des systèmes étudiés, courbes

de variations de G' et G'' ainsi que $\tan \delta$ ($= G''/G'$) en fonction de la fréquence, sont présentés dans la **Figure.V.9. (a et b)**. Ils ont été obtenus à la fin de la gélification acide (10 h) à 25 °C.

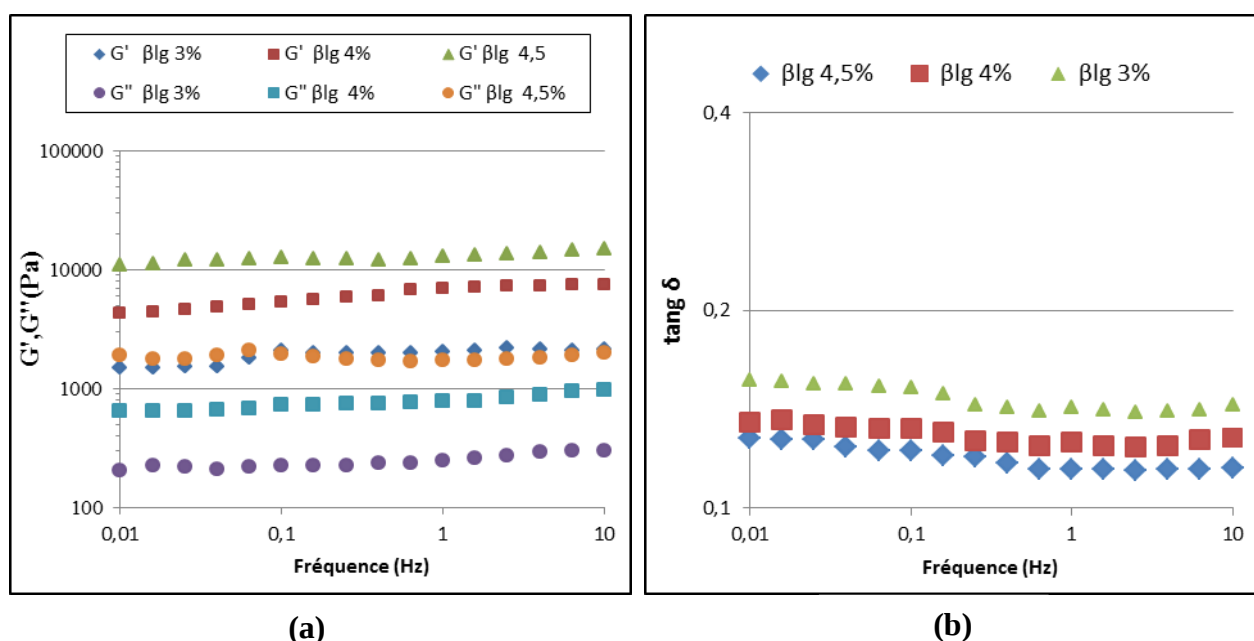


Figure.V.9. Spectres mécaniques des gels acides de β lg à différentes concentrations à 25 °C ; **(a)** G' et G'' en fonction de la fréquence; **(b)** $\tan \delta$ en fonction de fréquence en fin de gélification après 10 heures à 25 °C.

Le spectre mécanique d'un gel caractérise le type de gel formé. Si le gel est très fort (par exemple avec de nombreuses liaisons covalentes), les modules viscoélastiques sont indépendants de la fréquence. Ils sont légèrement dépendants de la fréquence dans le cas des gels physiques faibles (Clark & Ross-Murphy, 1987).

Quelque soit la concentration protéique étudiée de β lg (**Figure.V.9a**), les deux modules G' et G'' présentent une faible dépendance à la fréquence. Tous ces paramètres caractérisent les propriétés de gels viscoélastiques. On peut souligner le fait que la légère dépendance des modules G' et G'' (et $\tan \delta$) en fonction de la fréquence est typique de gels de protéines globulaires stabilisés en partie par des liaisons chimiques. Les résultats obtenus sont conformes aux travaux antérieurs concernant les protéines de lactosérum (Alting, et al. 2003a). La stabilisation de $\tan \delta$ dans les hautes fréquences est probablement liée au maintien de la structure du gel de β lg via des liaisons permanentes (covalentes) qui limite le réarrangement de la structure et donnent le comportement élastique de ces gels (Alting, et al. 2003b; Paulsson, et al. 1990). Ces liaisons ont été formées essentiellement lors de

l'agrégation thermique et probablement lors du réarrangement des agrégats (surtout dans des pH entre 4-5). Il a été indiqué dans la littérature la possibilité de formation de liaisons covalentes supplémentaires au cours de la gélification acide, cette possibilité est dépendante du nombre et de l'accessibilité des groupes thiol dans les agrégats de β lg (**Alting, et al. 2000; Alting, et al. 2003_a ; 2003b ; Mounsey & O'Kennedy 2007**).

La **Figure.V.9(b)** montre que les valeurs de $\tan \delta$ se rapprochent de 0,1 lorsqu'on augmente la concentration de β lg. La valeur obtenue de $\tan \delta$ est comprise entre 0,11 et 0,14. Un gel fort est un gel qui possède des grandeurs dynamiques G' et G'' très peu dépendantes de la fréquence avec $G' > 10 G''$ ($\tan \delta < 0,1$), sinon le gel est considéré comme faible (**Clark & Ross-Murphy 1987**). En se basant sur la définition de **Clark & Ross-Murphy (1987)**, on peut qualifier les gels acides de β lg (dans la gamme de concentration utilisée) comme de vrais gels mais relativement faibles.

En ce qui concerne les gels acides de Glob, les spectres mécaniques, courbes de variations de G' et G'' ainsi que de $\tan \delta$ en fonction de la fréquence, sont présentés dans la **Figure.IV.10 (a et b)**. Ils ont été obtenus à la fin de la gélification (10 h) à 25 °C.

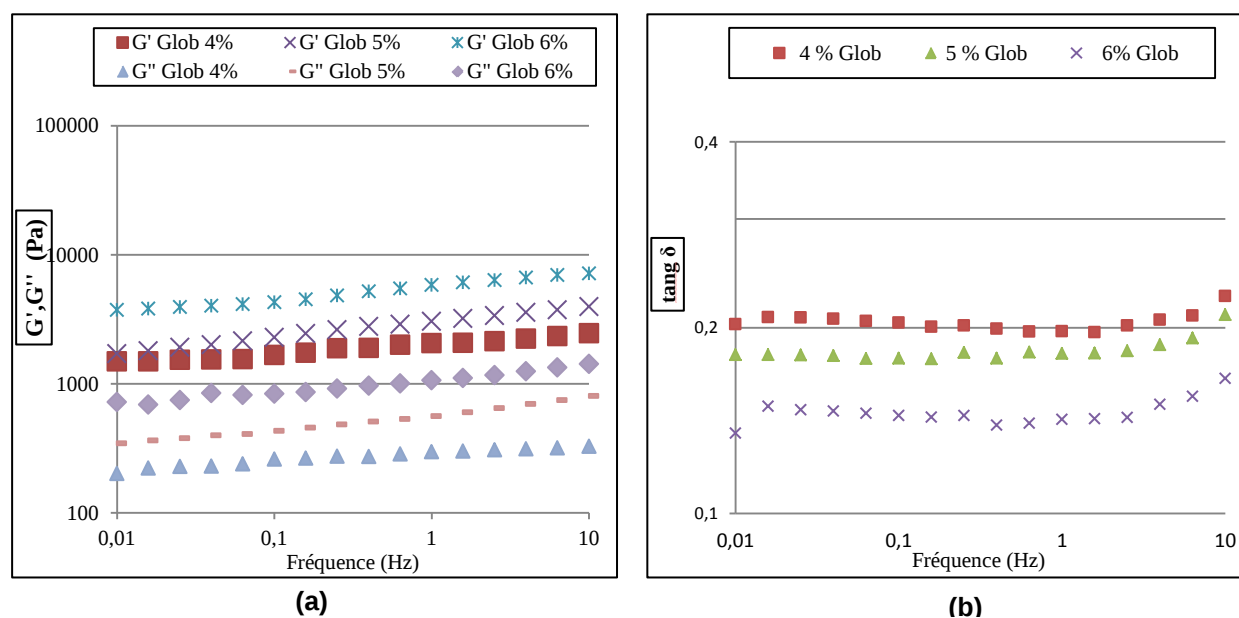


Figure.V.10. Spectres mécaniques des gels acides de Glob à différentes concentrations à 25 °C ; **(a)** G' et G'' en fonction de la fréquence; **(b)** $\tan \delta$ en fonction de fréquence en fin de gélification.

Au vu des courbes des module G' et G'' , il est clair que G' est toujours supérieur à G'' quelque soit la concentration de Glob engagée (**Figure.V.10a**). Après gélification, les spectres mécaniques (G' , G'' en fonction de la fréquence) des gels acides de Glob présentaient des valeurs de G' de ~7200, 3400, 2500 Pa à une fréquence de 10 Hz pour les concentrations de 6%, 5%, et 4% respectivement. L'augmentation du module d'élasticité (diminution de la valeur de $\tan \delta$) en fonction de la concentration de Glob est probablement due à l'augmentation des interactions protéiques et la formation d'un réseau de gel plus dense. Les modules G' et G'' sont assez dépendants de la fréquence, ce qui est caractéristique de gels physiques (associés par des liaisons de faible énergie). L'instabilité de $\tan \delta$ notamment aux hautes fréquences (> 1 Hz) indique que les réarrangements structuraux ont des durées de vie proches du temps de la sollicitation imposée (inverse de la fréquence) (**Hudson, et al. 2000; Li, et al. 2011**). Cette dépendance indique des points de jonction plus fragiles dans les gels de Glob comparativement à ceux de β lg. Selon la définition de **Clark and Ross-Murphy (1987)**, on peut qualifier les gels de Glob comme des gels viscoélastiques faibles. En effet, les échantillons ont été caractérisés par des valeurs de $\tan \delta$ de 0,22, 0,21 et 0,16 pour des concentrations respectives de Glob de 4%, 5% et 6%.

Les résultats obtenus de la gélification acide montrent que le comportement de Glob présente une similarité à celui des gels acides de soja étudiés dans les travaux de **Murekatete, et al. (2014)**.

V.3.2.2. Rhéologie des gels acides mixtes β lg/Glob

V.3.2.2.1. Rhéologie des gels acides mixtes formés à partir des protéines chauffées simultanément (voie 1).

Des mélanges protéiques de β lg et Glob natives à différents ratios massiques β lg/Glob ont été préparés à des concentrations protéiques (4 et 4,5%) inférieures à la C_{gth} préalablement à leur thermodénaturation; après formation des agrégats thermiques mixtes, les échantillons ont été acidifiés par l'ajout de GDL à des concentrations de 0,68-0,75% (m/m) (**voie 1**). Les propriétés rhéologiques des gels ont été suivies au cours de la gélification par mesures dynamiques. La **Figure.V.11** montre l'évolution des modules de conservation G' en fonction du pH.

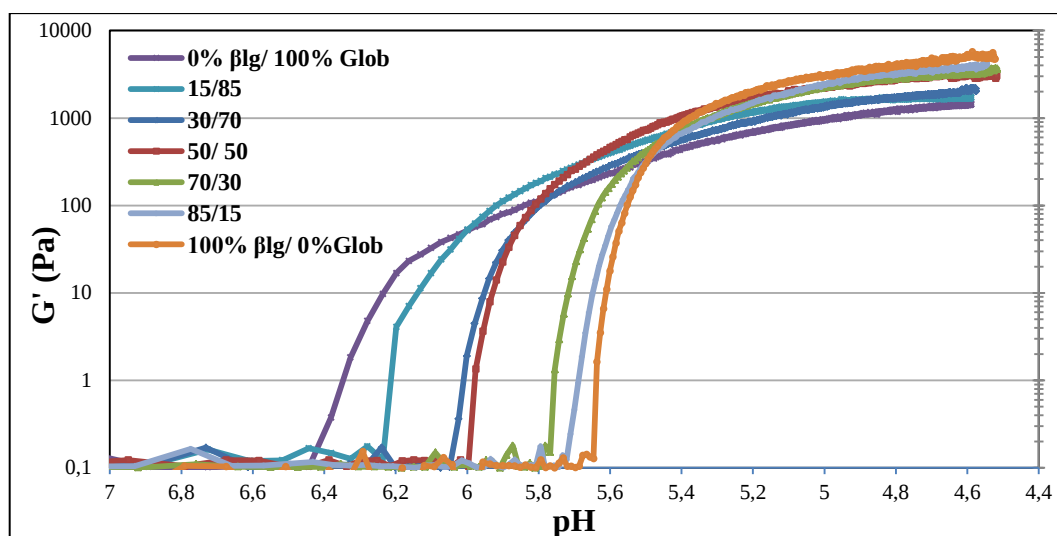


Figure.V.11. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH, pour des agrégats de β lg, de Glob et des agrégats mixtes à différents ratios massiques β lg/Glob à une concentration protéique de 4% incubés en présence de GDL (0,68% m/m) pendant 10 heures à 25 °C.

Face au nombre important d'échantillons représentés sur la **Figure.V.11.**, nous avons représenté uniquement l'évolution des valeurs de G' au cours de la gélification. Après 10 heures d'incubation avec le GDL, le pH des échantillons atteignait une valeur finale de ~4,4-4,6. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu pour les cinétiques d'acidification des systèmes purs de β lg et de Glob (Cf. **Chapitre V.3.1.1**).

D'après la **Figure.V.11.** et le **Tableau.V.2.**, le P_{gel} pour Glob se produisait (~14 minutes) avant celui de β lg (~48 minutes) soit à des pH respectifs de 6,47 et 5,64. Cependant pour les gels mixtes, le P_{gel} ainsi que le début du plateau pour G' apparaissait plus tardivement et à un pH associé plus bas en fonction de l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges. De plus, l'augmentation du ratio massique β lg/Glob conduit à l'augmentation des valeurs de G' et à la diminution des valeurs de $\tan \delta$. Le décalage du P_{gel} entre la β lg et la Glob est vraisemblablement dû aux propriétés de surface (charge, hydrophobicité de surface) des agrégats formés et aux pI différents de chaque protéine. Ce décalage est aussi lié à la différence de taille et de poids moléculaires des agrégats formés lors de la thermodénaturation des protéines (**Alting, et al. 2004; Guyomarc'h, et al. 2003**). En effet, les gros agrégats de Glob remplissent l'espace rapidement et forment un réseau de gel avec la réduction des répulsions électrostatiques, ce qui entraîne une diminution du temps de

gélification contrairement aux agrégats mixtes de β lg/Glob qui sont modulés en taille par la présence de β lg et gélifient plus tardivement (Cf. **Chapitre IV**).

Tableau.V.2. Propriétés de gélification des gels préparés à partir d'agrégats mixtes à différents ratios massiques β lg/Glob (voie 1) en présence de GDL (0,68% m/m) à 25 °C.

Echantillons à 4% (m/m)	$P_{gel}^{(A)}$ (min)	pH ^(B) correspondant	$G'_{final}^{(C)}$ (Pa) (après 10h d'incubation)	$\tan \delta_{final}^{(D)}$
Glob	14 ± 2,2 a	6,47 ± 0,2 a	1326 ± 9,7 a	0,22 ± 0,01a
βlg	48 ± 3,9 d	5,64 ± 0,2 c	4559 ± 11,1 d	0,12 ± 0,01d
30/70	18 ± 0,3 ab	6,08 ± 0,1 b	2080 ± 8,1 b	0,19 ± 0,01 ab
βlg/Glob 50/50	21 ± 0,1 b	5,98 ± 0,1b	3335 ± 0,1 c	0,16 ± 0,01 b
70/30	37 ± 0,9 bc	5,79 ± 0,1 bc	3579 ± 0,1 c	0,14 ± 0,02 c

Les valeurs des colonnes suivies par le même lettre minuscule (a et b) ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

A : point de gélification P_{gel} : point de croisement entre G' et G'' ($\tan \delta = 1$).

B : pH correspondant au temps de gélification.

C : module d'élasticité G' final après 10 heures d'incubation à 25 °C.

D : $\tan \delta_{final}$ (G''/G') après avoir atteint les plateaux.

Les modules d'élasticités G' des gels mixtes obtenus à différents ratios augmentent avec la proportion de β lg dans les mélanges. Par exemple, dans le cas du mélange au ratio β lg/Glob de 30/70, la valeur de G' en fin de gélification est accentué de ~60% par rapport à celle du gel formé à partir de Glob seules. Des résultats proches ont été mentionnés dans la littérature concernant l'amélioration de la force des gels acides de soja par l'ajout de lait écrémé en poudre (**Roesch & Corredig 2006**). En se basant sur la définition de **Clark & Ross-Murphy (1987)**, les gels mixtes acides formés à partir des protéines chauffées en mélange (voie 1) peuvent être qualifiés comme de vrais gels (gels solides) viscoélastiques ($G' > G''$).

Concernant les gels mixtes formés à une concentration protéiques de 4,5% (**Annexe, Figure.6.**), le comportement général était identique et les valeurs obtenues de G' étaient supérieures à celles des gels à 4%. Cela est dû à l'augmentation des interactions protéines-protéines lors de l'acidification et du rapprochement des amas protéiques sous l'effet de la réduction des répulsions électrostatiques. Ceci conduit à l'augmentation de la densité de gels conduisant par la suite l'augmentation de la force des systèmes gélifiés.

Afin de déterminer les propriétés mécaniques des gels obtenus, les spectres mécaniques (G' , G'' et δ) ont été établis pour les gels mixtes (voie 1) à la fin de la gélification (10 h) à 25 °C. Les résultats sont présentés dans la **Figure.V.12.** et la **Figure.V.13.**

La **Figure.V.12.** montre que quelque soient les systèmes β lg/Glob obtenus selon la voie 1, G' est toujours supérieur à G'' et les deux modules présentent une dépendance relative à la fréquence, caractéristique de gels physiques. L'accroissement des modules G' et G'' avec la fréquence, pour ces gels mixtes, est un signe de l'existence de différentes liaisons physiques, avec des temps de relaxation de l'ordre du temps de la sollicitation mécanique imposée (inverse des fréquences).

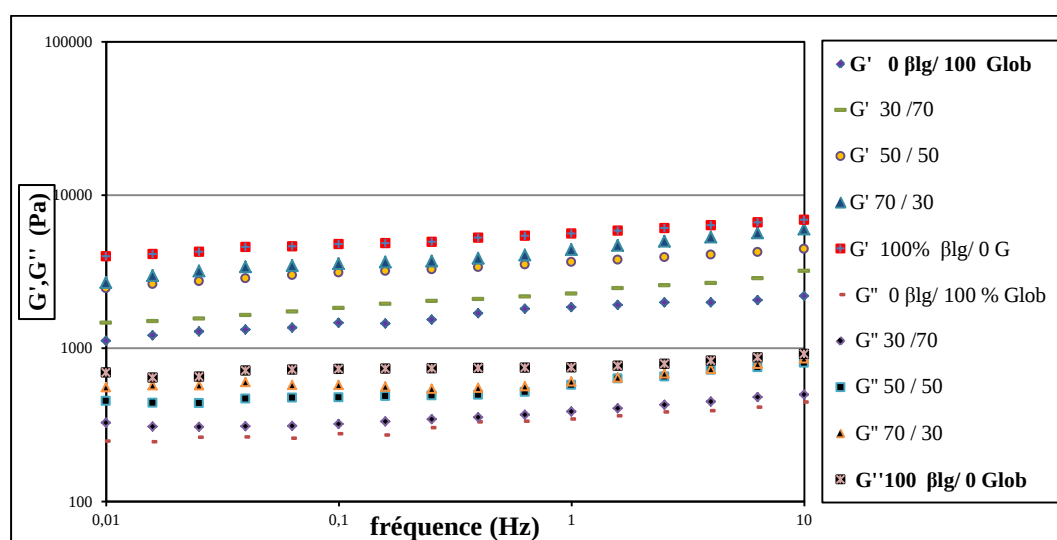


Figure.V.12. Spectres mécaniques (G' , G'' en fonction de la fréquence) en fin de gélification (après 10 heures) à 25 °C des gels mixtes (voie 1) préparés à différents ratios massiques β lg/Glob et à une concentration protéique de 4%.

Le comportement de ces gels mixtes est moins élastique (G'_{final}) que celui obtenu avec la β lg seule, mais plus élastique que celui des gels de Glob seules.

La **Figure.V.13.** montre l'allure des spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) réalisés en fin de gélification acide pour différents systèmes d'agrégats mixtes β lg/Glob (voie 1). Les résultats obtenus ont été comparés aux évolutions de $\tan \delta$ des gels acides de β lg et Glob précédemment étudiés.

Les gels mixtes (à concentration de 4%) ont été caractérisés par des valeurs de $\tan \delta_{\text{final}}$ de 0,19, 0,16 et 0,14 respectivement pour les ratios β lg/Glob de 30/70, 50/50, 70/30. De

même, la variation de $\tan \delta$ montre une faible dépendance de ces mélanges dans le domaine des faibles fréquences (inférieure à 1 Hz). Au-delà de 1 Hz, $\tan \delta$ se stabilise pour le gel de β lg et le système au ratio 70/30, tandis que cette dépendance semble plus accentuée pour les gels de Glob ainsi que pour les gels mixtes contenant une proportion élevée de Glob. Le profil de $\tan \delta$ est proche de celui de la protéine majoritaire dans les mélanges β lg/Glob. La présence de β lg contribuerait donc au renforcement de la cohésion de la structure des gels. Il semble ainsi que l'élasticité finale des gels mixtes est liée : (i) au nombre de liaisons covalentes engagées dans les systèmes engendrées par la β lg lors du chauffage des protéines, conduisant à la formation d'agrégats mixtes (Cf. **Chapitre IV**); (ii) probablement à des échanges covalents lors de la structuration des gels mixtes.

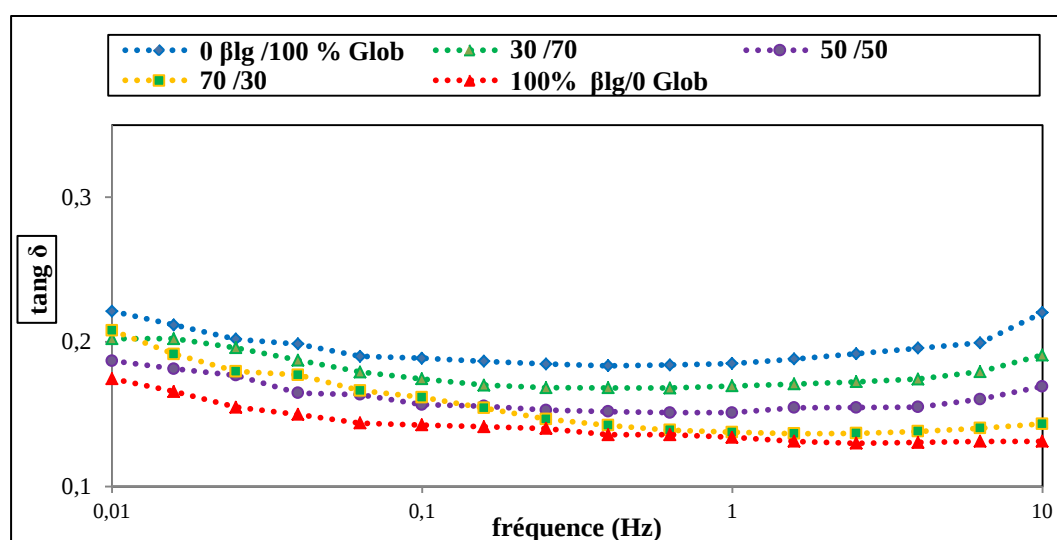


Figure.V.13. Spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) des gels mixtes acides de β lg/Glob préparés selon la voie 1 à une concentration de 4%, en fin de gélification (après 10 heures) à 25 °C.

Pour tous les gels mixtes β lg/Glob préparés à base d'agrégats mixtes (voie 1), les valeurs de $\tan \delta$ mesurées étaient supérieures à 0,1. D'après le classement de **Clark & Ross-Murphy (1987)**, nous pouvons qualifier ces gels mixtes comme des gels viscoélastiques faibles, avec malgré tout un gain d'élasticité remarquable par rapport aux gels de Glob seuls.

La même étude rhéologique a été menée sur des mélanges de β lg/Glob à une concentration initiale de 4,5% (**Annexe, Figure.7**). L'augmentation de concentration en protéines se traduit logiquement par une augmentation de l'agrégation protéique et un renforcement de la force des gels. Les résultats des spectres mécaniques de ces gels mixtes

ont montré des profils similaires à ceux des gels étudiés précédemment (4%), avec une augmentation des valeurs de G' , G'' (**Annexe, Figure.7 et Figure.8**). Les valeurs de $\tan \delta$ sont proches de celles enregistrées dans les gels mixtes à une concentration de 4%. Ceci indique que malgré l'augmentation de la concentration protéique (dans la gamme de concentration étudiée), le comportement rhéologique de ces gels resterait viscoélastique avec des caractéristiques de gels physiques faibles.

V.3.2.2.2. Rhéologie des gels acides mixtes de β lg/Glob formés à partir de mélanges d'agrégats thermiques obtenus séparément (voie 2)

Des mélanges d'agrégats protéiques thermiques de β lg et Glob, obtenus dans les mêmes conditions opératoires (pH 7,2, 5 mM NaCl, et 85 °C pendant 60 min), ont été préparés à une concentration protéique (4%) inférieure à la C_{gth} (**voie 2**). Les mélanges d'agrégats protéiques à différents ratios massiques β lg/Glob ont été agités pendant 30 min et acidifiés par l'ajout de GDL à une concentration de 0,68%.

Les propriétés mécaniques des gels formés ont été suivies pendant le processus de gélification. Les résultats sont présentés dans la **Figure.V.14.** et le **Tableau.V.3.**

La **Figure.V.14.** montre l'évolution des modules de conservation G' en fonction du pH. Comme discuté auparavant, le point de transition sol/gel est dépendant de la composition protéiques des gels mixtes. Le point de transition des gels mixtes et les plateaux pour G' sont atteints plus tardivement avec l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges. Cela indique que les gels contenant des proportions élevées de Glob gélifient plus rapidement par rapport au gel de β lg et à un pH plus élevé (5,8, 6,0, et 6,11) pour les ratios β lg/Glob respectivement de 70/30, 50/50 et 30/70 (**Tableau.V.3.**). Après 10 heures d'incubation avec le GDL, le pH des échantillons atteignait une valeur de ~4,4-4,6 en cohérence avec les résultats précédents (Cf. **Chapitre V.3.1.1**).

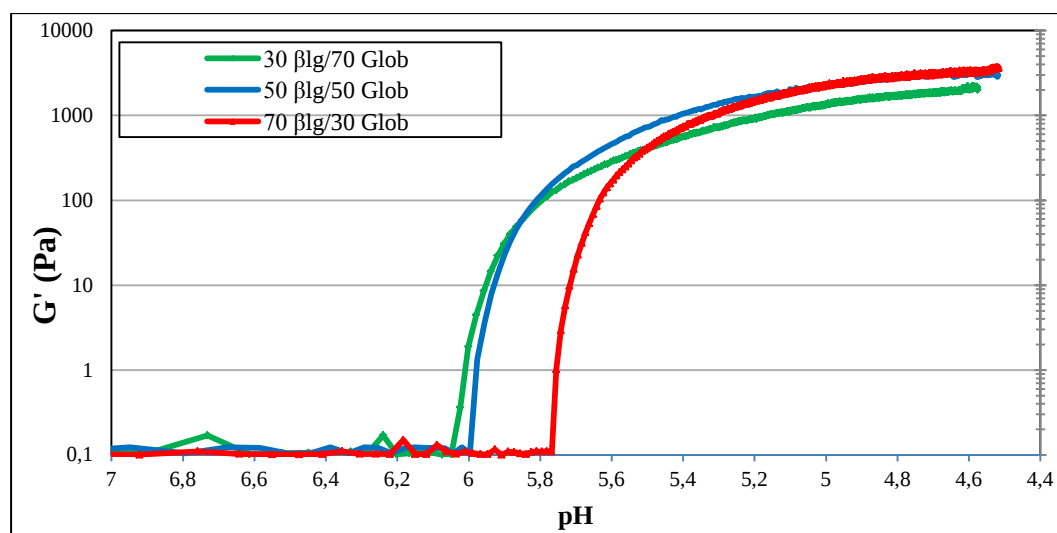


Figure.V.14. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH pour des mélanges d'agrégats à différents ratios $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ (voie 2) à une concentration protéique de 4%, incubés en présence de GDL pendant 10 heures à 25 °C.

Tableau.V.3. Propriétés de gélification des gels acides préparés à partir de mélanges d'agrégats (voie 2) à différents ratios en présence de GDL à 25 °C.

Echantillons à 4% (m/m)	P _{gel} ^(A) temps pour tang δ =1 (min)	pH ^(B) correspondant	G' final ^(C) (Pa) Après 10h d'incubation	tang δ _{final} ^(D)	
Glob	14 ± 2,2 a	6,40 ± 0,2 a	1326 ± 9,7 a	0,22 ± 0,01 b	
βlg	48 ± 3,9 d	5,64 ± 0,2 c	4559 ± 11,1 d	0,12 ± 0,01 a	
βlg/Glob	30/70	17,5 ± 0,3 ab	6,11 ± 0,1 b	2079 ± 8,5 b	0,22 ± 0,02 b
	50/50	21,5 ± 0,9 b	6,00 ± 0,1b	3110 ± 13,1 c	0,21 ± 0,02 b
	70/30	36 ± 1,2 bc	5,80 ± 0,1 bc	3292 ± 10,1 d	0,20 ± 0,03 b

Les valeurs des colonnes suivies par le même lettre minuscule (a et b) ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

A : point de gélification P_{gel} : point de croisement entre G' et G'' ($\tan \delta = 1$).

B : pH correspondant au temps de gélification.

C : module d'élasticité G' final après 10 heures d'incubation à 25 °C.

D : $\tan \delta_{\text{final}}$ (G''/G') après avoir atteint les plateaux.

Le **Tableau.V.3.** montre aussi que l'augmentation de la proportion de βlg dans les mélanges conduit à l'augmentation des valeurs finales de G' contrairement aux valeurs de $\tan \delta$ qui restent proches de 0,2 (0,22, 0,21, 0,20) pour les gels mixtes (respectivement aux

ratios $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ de 30/70, 50/50, 70/30) et non significativement différentes de celles des gels purs de Glob (0,20).

D'après la **Figure.V.14.** et **Tableau.V.3.**, les cinétiques de gélification des gels préparés à partir des mélanges d'agrégats de βlg et Glob (voie 2) conduisent à des profils et des données similaires à ceux obtenus pour les agrégats mixtes selon la voie 1 (Cf. **Figure.V.11.** et **Tableau.V.2.**), à l'exception des valeurs de $\tan \delta$ indépendantes de la part de βlg dans les mélanges et des valeurs de G' final inférieures d'environ 10% dans le cas des mélanges aux ratios $\beta\text{lg}/\text{Glob}$ de 50/50 et 70/30.

Afin de mieux apprécier les propriétés mécaniques des gels préparés à partir des mélanges d'agrégats (voie 2), les spectres mécaniques (G' , G'' et $\tan \delta$) ont été établis en fin de gélification (10 h) à 25°C. Les résultats sont présentés dans la **Figure.V.15.** et la **Figure.V.16.**

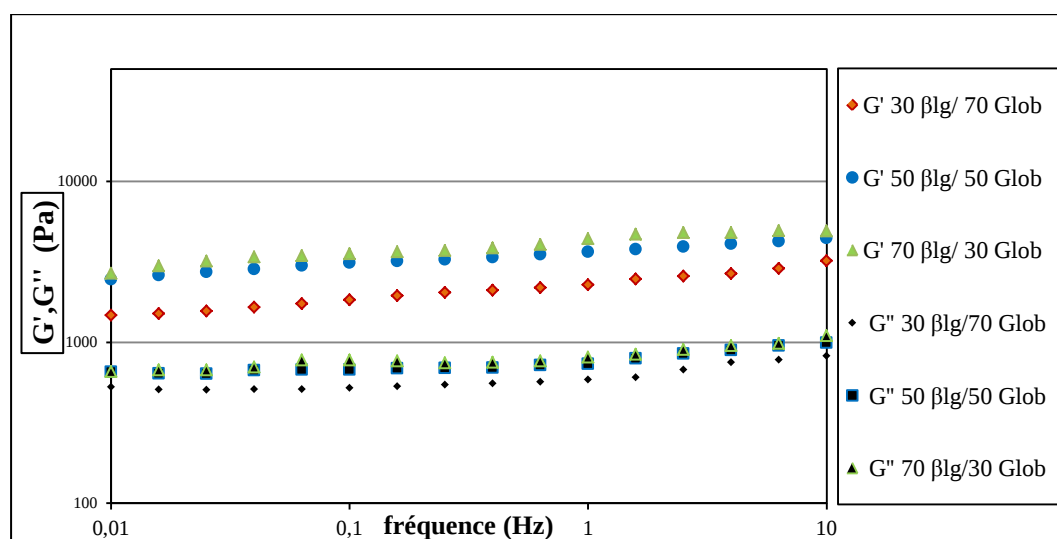


Figure.V.15. Spectres mécaniques (G' , G'' en fonction de la fréquence) en fin de gélification (après 10 h) à 25 °C pour des gels mixtes préparés à partir des mélanges d'agrégats (voie 2) à une concentration protéique de 4%.

La **Figure.V.15.** montre que quelque soient les mélanges, G' est toujours supérieur à G'' (gels viscoélastiques) et les deux modules présentent une dépendance relative à la fréquence. La contribution du module visqueux G'' était plus marqué dans des fréquences supérieures à 1 Hz par rapport à celle observée pour les gels mixtes obtenus selon la voie 1. L'augmentation de G'' dans les hautes fréquences est un indice de la formation d'un gel

moins fort. Cela peut être attribué au nombre peu élevé de liaisons permanentes entre les agrégats de β lg et de Glob, donnant un gel à plus faible densité de maillage.

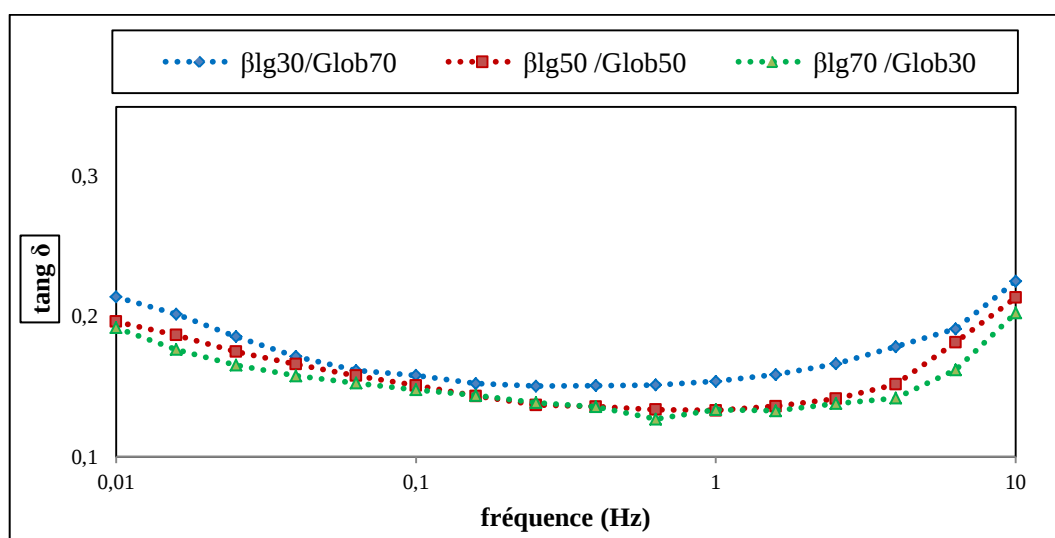


Figure.V.16. Spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence), pour des gels mixtes de β lg/Glob préparés selon la voie 2, à une concentration protéique de 4% en fin de cinétique de gélification (après 10 h) à 25 °C.

La **Figure.V.16.** montre l'allure des spectres mécaniques ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) réalisés en fin de gélification sur des gels issus de mélanges d'agrégats de β lg et de Glob (voie 2). Une dépendance bien marquée du profil de $\tan \delta$ dans les hautes fréquences (à partir de 1 Hz) a été constatée avec croissance de la $\tan \delta$ dans ce domaine de fréquence. Cette augmentation de $\tan \delta$ avec la fréquence s'explique par (i) la faiblesse de ces gels mixtes et (ii) par l'instabilité du réseau de gel due aux réarrangements forts de la structure qui se produit dans ce domaine de fréquences (**Li, et al. 2007**). Ceci pourrait traduire la prédominance des agrégats de Glob lors de la gélification des mélanges. En effet, cela peut être expliqué par la gélification des agrégats de Glob à un pH plus élevé ($\text{pH} > 6$) avant la gélification acide des agrégats de β lg, permettant à ces espèces protéiques (Glob) de former un maximum d'interactions entre elles alors que les agrégats de β lg participeraient plus tardivement au réseau (rappelons que dans ce cas, il ne s'agit pas d'agrégats thermiques mixtes). Ce phénomène de gélification précoce des agrégats de Glob peut conduire à une plus faible densité de « points de jonction » (interactions) entre les agrégats de β lg et Glob lors de gélification acide.

Il semblerait donc que l'absence d'interactions intermoléculaires *a priori* entre les sous-unités de Glob et de β lg conduit à la formation de gels acides moins fermes et moins élastiques par rapport à ceux élaborés selon la voie 1. Ceci confirme l'importance du greffage covalent dans et entre les agrégats mixtes pour l'amélioration de l'élasticité et la fermeté des gels acides (voie 1).

La même étude rhéologique a été menée sur des mélanges de β lg/Glob à une concentration initiale de 4,5% (**Annexe, Figure.9**). Les résultats des spectres mécaniques de ces gels mixtes ont montrés des comportements analogues aux gels mixtes à 4%.

V.3.3. Capacité de rétention d'eau (Cre) des gels mixtes (β lg/Glob)

La capacité de rétention d'eau est un facteur important dans la texture et dans l'aspect des gels formés ainsi que pour leur stabilité au cours du vieillissement. Cette caractéristique reflète le pouvoir du gel à piéger l'eau dans sa structure et de réduire les phénomènes d'exsudation et relargage d'eau ou « synérèse ». Généralement, les structures de gel les plus poreuses et les plus ouvertes peuvent facilement expulser l'eau (**Bryant & McClements 1998; Renkema 2004**). La capacité de rétention d'eau est dépendante de la nature et la stabilité des interactions protéines-protéines et protéines-eau influencées par le pH, la force ionique et la concentration en protéines (**Campbell, et al. 2009; Maltais, et al. 2005**). La **Figure.V.17**. montre la capacité de rétention de l'eau (Cre) des gels acides de β lg et de Glob à des concentrations de 4% (m/m), ainsi que celle des gels mixtes issus de systèmes d'agrégats à différents ratios massiques β lg/Glob lorsque les protéines ont été chauffées simultanément (voie 1) ou séparément (voie 2).

A la même concentration protéique (4%), les résultats montrent que les agrégats de Glob possèdent une faible capacité de rétention d'eau qui atteint ~42%, tandis que cette capacité pour le gel de β lg est deux fois plus grande ~93%. Ces valeurs sont proches des résultats rapportés dans la littérature concernant la capacité de rétention d'eau des gels acides (préparés par le GDL) pour les protéines de soja et de lactosérum (**Campbell, et al. 2009; Cavallieri, et al. 2007**).

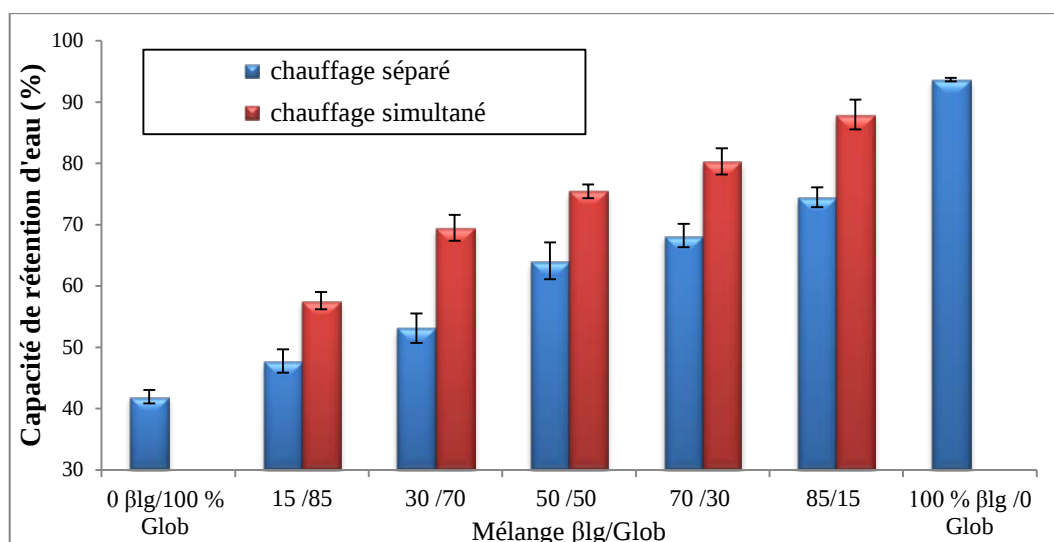


Figure.V.17. Capacité de rétention d'eau des gels de βlg, Glob et de systèmes d'agrégats à différents ratios βlg/Glob respectivement de 15/85 ; 30/70 ; 50/50 ; 70/30 ; 85/15 obtenus par gélification acide selon la voie 1 et la voie 2 à une concentration protéique de 4%.

Il est important de noter qu'après 24 heures d'incubation les gels de Glob et des gels mixtes préparés selon la voie 2, ont montré une synérèse relativement importante avant la mesure de Cre. Ceci peut être s'expliquer par la structure plus poreuse, ainsi qu'au réarrangement accentué de la structure de ces gels (**Lucey, et al. 1999; van Vliet, et al. 2004**) (**van Vliet, et al. 2004**), tandis que ce phénomène n'a pas été observé pour la même période d'incubation pour les gels acides de βlg. Ces observations sont fortement corrélées avec les spectres mécaniques de ces systèmes gélifiés (gel de Glob, gels mixtes préparés selon la voie 2) (**Figure.V.16.**). Ceci confirme les résultats rapportés dans la littérature concernant le rôle de liaisons permanentes (covalentes) dans la stabilisation de la structure du gel (**Alting, et al. 2000; Campbell, et al. 2009; Paulsson, et al. 1990**).

La forte capacité de rétention d'eau enregistrée pour les gels de βlg est expliquée par l'augmentation des différentes forces physiques dans le système avec l'implication de liaisons covalentes qui interviennent au cours de la thermodénaturation, et probablement lors de la gélification de cette protéine (**Alting, et al. 2002; Alting, et al. 2000**). Cela rendrait la structure du gel de βlg plus stable et rigide, conduisant à une meilleure conservation de l'eau en raison d'un réseau plus dense possédant une force de capillarité plus importante (**Remondetto, et al. 2002**). Cette observation est cohérente avec les résultats des spectres mécaniques et l'obtention de gels de βlg plus élastiques que les gels de Glob et que les gels mixtes.

Les agrégats de Glob sont formés principalement par des liaisons non covalentes pendant le traitement thermique et après acidification du système avec une très faible implication des liaisons covalentes (SS) participant à la stabilisation de la structure des agrégats (**Mession, et al. 2015; O'Kane, et al. 2005; Shand, et al. 2007**). Ceci conduit probablement à la formation d'une structure poreuse de faible capacité de rétention d'eau (**Figure.V.17.**). Il a été signalé dans la littérature que l'implication des liaisons covalente dans la formation des agrégats de protéine de soja affecte positivement la microstructure de gels acides de ces protéines, ce qui conduit à l'amélioration la capacité de rétention d'eau (**Campbell, et al. 2009**).

Par ailleurs, il est constaté que les systèmes à base d'agrégats mixtes (voie 1) sont capables de former des gels avec une capacité de rétention d'eau plus élevée que ceux à base de mélanges d'agrégats. Cette augmentation est estimée à ~20% dans les systèmes préparés selon la voie 1 par rapport aux systèmes obtenus selon la voie 2. Il a été observé également que la capacité de rétention d'eau des gels s'améliore avec l'apport massique de β lg dans les mélanges quelque soit le mode de préparation (voie 1 ou voie 2). Par exemple, la valeur de Cre est augmentée de ~38% et 14% pour les systèmes au ratio β lg/Glob de 30/70 obtenus respectivement selon la voie 1 et la voie 2, par rapport à la valeur de Cre des gels d'agrégats de Glob.

Concernant les gels mixtes élaborés à partir de mélanges d'agrégats, une amélioration de la capacité de rétention de l'eau a été observée en fonction de l'augmentation de β lg dans les mélanges, due vraisemblablement à l'augmentation des interactions physiques apportées par la β lg. Cette présence de β lg dans les gels mixtes contribue à l'amélioration de la structure et la diminution de la porosité par rapport au gel acide de Glob.

Les résultats de Cre des différents échantillons étudiés sont cohérents avec les résultats de spectres mécaniques (**Figure.V.13.** et **Figure.V.16.**). L'augmentation de la rétention d'eau semble corrélée à l'augmentation de l'interconnexions entre agrégats protéiques et à la diminution de la porosité du système.

V.3.4. Etude de la microstructure des gels acides mixtes β lg/Glob par MCBL

La microstructure des gels acides mixtes étudiés précédemment (à une concentration protéique de 4% m/m) préparés selon la voie 1 ou selon la voie 2, a été observée par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Les micrographies obtenues par MCBL sont

présentées dans la **Figure.V.18**. Avant l'ajout de GDL, les solutions protéiques thermisées de β lg et Glob (témoins) montrent une fluorescence uniformément répartie dans le milieu ; aucun réseau n'est observé à ce stade. Cela est dû à l'utilisation d'une concentration protéique inférieure à la concentration minimale de gélification thermique $C_{g_{th}}$. Il a été constaté également l'apparition de très petites particules fluorescentes à cette échelle et qui sont considérées comme des agrégats thermiques de grande taille (**Roesch & Corredig 2005**).

Dans la gamme de concentration protéique utilisée, il apparaît que les gels à froid formés de β lg et Glob sont globalement homogènes à l'échelle microscopique. Il faut bien noter que les zones jaunes représentent le réseau protéique et les zones sombres représentent les pores ou les cavités aqueuses.

A la concentration protéique étudiée (4%), le gel acide de β lg révèle une structure fibrillaire (ou filamenteuse) constituée par des filaments interconnectés de façon ordonnée et homogène; la taille des pores est faible et l'inter-connectivité entre les particules est importante comparativement aux autres gels. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature concernant la gélification à froid (par le GDL) de protéines de lactosérum précédée par un traitement thermique dans des conditions opératoires proches (**Britten & Giroux 2001; Lucey, et al. 1999; Roesch, et al. 2004**).

Cette structure résulte de l'interconnection d'agrégats fibrillaires de β lg formés lors du traitement thermique à faible force ionique et à pH neutre. L'ajustement du pH par le GDL induit la réduction des répulsions électrostatiques, ce qui tend au rapprochement de ces agrégats à leur état fibrillaire de façon ordonnée, ce qui tend à réduire la taille des pores. L'augmentation de l'interaction et probablement des échanges covalents qui se produisent lors du réarrangement de la structure du gel acide de β lg, donne un réseau compact (**McClements & Keogh 1995**).

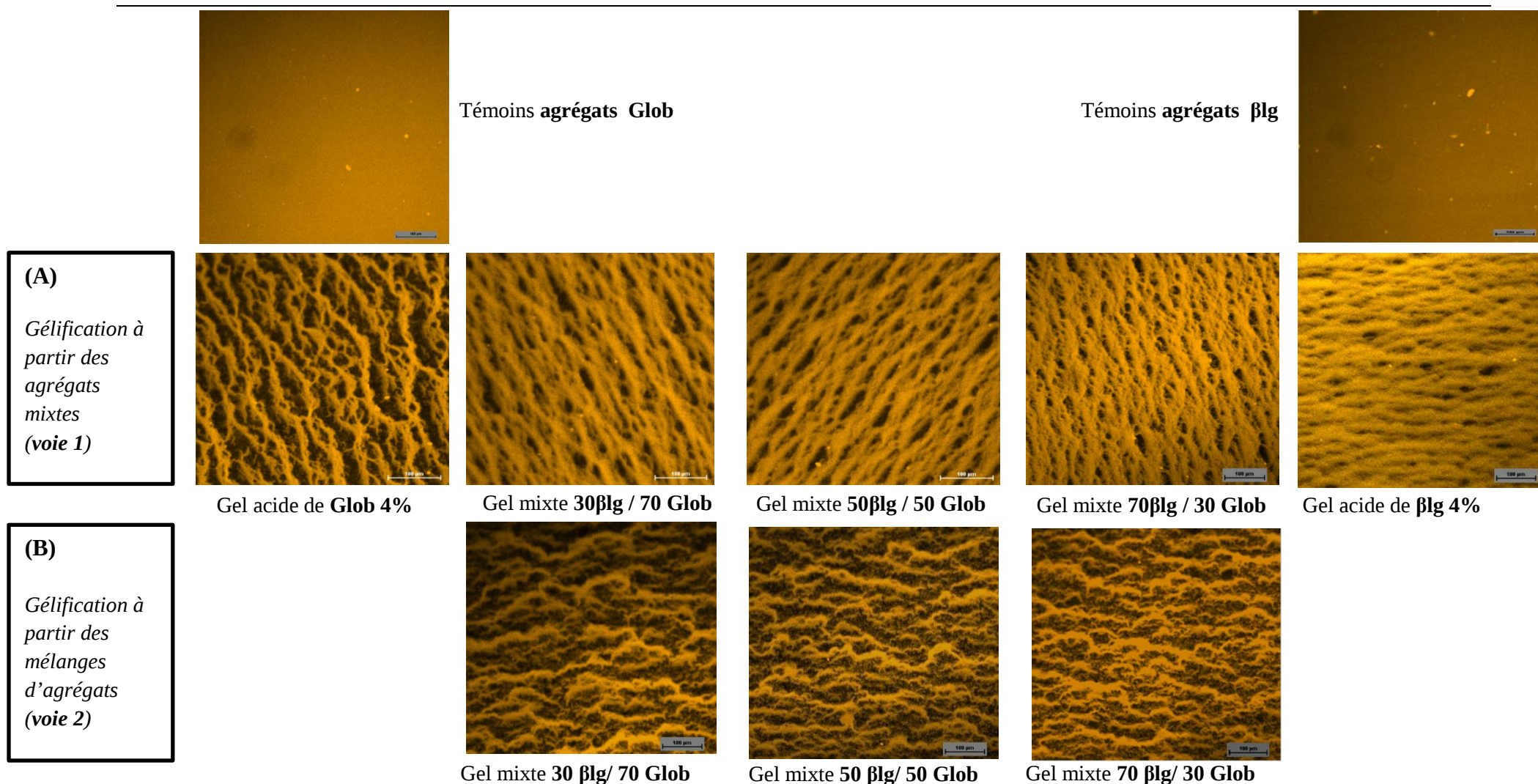


Figure.V.18. Images microscopiques par MCBL (Barre d'échelle = 100 μm) des gels acides de βlg et Glob ainsi que des différents gels acides mixtes, obtenus à partir des agrégats mixtes de βlg /Glob et à partir des mélanges d'agrégats après 24h d'incubation à 25 °C. La concentration protéique est de 4% (m/m) pour l'ensemble des échantillons.

Le gel acide de Glob montre une structure moins régulière et plus ouverte constituée par des filaments branchés très irréguliers (**Figure.V.18.A**). Il a été constaté en effet que la connectivité entre les amas protéiques était plus faible, avec la présence de pores plus larges par rapport à ceux observés dans les gels de β lg. La structure de ce réseau protéique composé d'agrégats étendus et branchés peut être attribuée : (i) à la plus grande taille d'agrégats (Cf. **Chapitre IV**) par rapport à ceux de β lg (ii) à la nature des liaisons (non covalentes) qui prédominent pour ces globulines de pois dénaturées lors de la gélification acide (liaisons de nature hydrophobe ou hydrogène) (**Alting, et al. 2004**); (iii) à la gélification précoce (pH > 6) qui mène à la formation d'un réseau moins homogène et plus aléatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature concernant la gélification à froid des protéines de pois et de soja (**Mession, et al. 2013; Roesch, et al. 2004**).

Les structures des gels acides mixtes β lg/Glob élaborés à partir des agrégats mixtes sont présentées dans la **Figure.V.18 A**. On visualise des réseaux fibrillaires continus des deux protéines associées avec une diminution de la taille des pores du réseau qui devient plus fin avec l'augmentation de la part de β lg dans les mélanges. La β lg contribue donc à une structure plus homogène et resserrée du réseau de gel mixte par rapport à celui de Glob. Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés dans la littérature concernant la gélification à froid (par GDL) de mélanges de protéines de lactosérum et de soja (**Roesch, et al. 2004**). Ces résultats sont aussi cohérents avec les résultats obtenus dans l'approche rhéologique (**Figure.V.13**), où il a été montré que l'augmentation de la proportion de β lg dans les gels mixtes obtenus par la voie 1, conduit à la formation de gels plus fermes et élastiques que ceux de Glob seul.

En ce qui concerne les gels mixtes élaborés à partir des mélanges d'agrégats (**Figure.V.18 B**), l'analyse de la microstructure de ces gels montre la formation d'un réseau continu mais plus hétérogène et désordonné que dans le cas des gels mixtes précédents (voie 1). Ces réseaux semblent composés de filaments grossiers et irréguliers attribués aux agrégats de Glob, qui seraient moins connectés aux agrégats fibrillaires plus petits de β lg. Le contraste diminue proportionnellement avec la part de β lg dans les mélanges. Ces réseaux de gels filamenteux sont moins denses dans le cas des ratios β lg/Glob de 30/70 et 50/50, ce qui conduit à l'élaboration d'une structure plus poreuse par rapport aux systèmes mixtes étudiés précédemment (voie 1). Pour le ratio 70/30, le réseau protéique devient plus régulier et plus dense, ce qui conduit à une légère diminution de la porosité dans ce système.

Les observations microscopiques de ces systèmes mixtes peuvent être corrélées aux comportements rhéologiques déjà discutés pour les gels élaborés selon la voie 2 (**Figure.V.16**). Ce mode d'élaboration des gels mixtes permet donc d'obtenir une structure poreuse et moins structurée correspondant à un profil rhéologique d'un gel moins ferme et moins élastique comparativement au cas de la voie 1.

La mise en oeuvre d'agrégats mixtes affecte positivement la microstructure des gels acides mixtes, résultant en un réseau ordonné, continu avec une porosité faible et un comportement plus élastique par rapport au gel acide de Glob. Cette modification des propriétés des gels mixtes par rapport à ceux de Glob est probablement due à aux propriétés structurales (taille et poids moléculaires) des agrégats formés par différentes interactions intermoléculaires et notamment des liaisons covalentes entre les sous-unités de Glob et de β lg lors de leur chauffage simultané (Cf. **Chapitre IV**).

Les observations microscopiques des différents échantillons étudiés sont cohérentes avec les résultats de l'étude rhéologique et la capacité de rétention de l'eau de ces échantillons (**Figure.V.13, V.16, V.17**).

V.4. Conclusion

Malgré la concentration faible de Glob utilisées dans cette étude par rapport à celle utilisée souvent dans la littérature, la Glob de pois à l'état d'agrégats solubles présente de bonnes propriétés de gélification à froid par voie acide. La concentration minimale de gélification acide de la Glob est plus de 2 fois plus faible que la concentration de gélification thermique.

Dans les conditions expérimentales choisies, la gélification acide de Glob est plus rapide et se réalise à un pH plus élevé (environ 6,5) par rapport à celui de β lg (environ 5,6); en effet, pour une cinétique d'acidification similaire le point de gel de Glob se produit trois fois plus tôt que le point de gel de β lg.

L'agrégation de la Glob à force ionique très faible, conduit à la formation d'un gel faible et moins élastique que celui de β lg. Le gel présente une structure fibrillaire très poreuse et moins ferme par comparaison au gel formé avec la protéine sérique.

L'amélioration des propriétés mécaniques et structurales des gels de Glob est possible par la formation d'agrégats mixtes avec la β lg. L'incorporation de β lg dans le mélange avec une proportion de 30% conduit à l'amélioration de la force du gel de l'ordre de 60%, avec l'obtention d'un gel présentant une structure plus ordonnée et moins poreuse par rapport au gel acide de Glob.

La préparation des gels acides à base de mélanges d'agrégats de β lg et Glob obtenus séparément, ne présente pas une bonne alternative pour améliorer les propriétés mécaniques finales des gels qui semblent dominés par le comportement des agrégats de Glob lors de la gélification.

La thermodénaturation simultanée des protéines permettant d'obtenir des agrégats mixtes avec des propriétés structurales contrôlées par la β lg, serait un facteur clé pour l'obtention de gels de propriétés mécaniques satisfaisantes et de caractéristiques plus proches des gels purs de β lg.

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier et de comprendre les mécanismes d'interactions mises en jeu entre différentes sources protéiques, une végétale (les globulines du pois) et une laitière (la β -lactoglobuline), afin d'obtenir des agrégats solubles ayant des aptitudes à gélifier par voie acide. Ce système mixte non-décrit précédemment a été choisi comme système modèle afin d'étudier le comportement d'agrégation du mélange β lg/Glob dans différentes conditions physicochimiques (concentration protéiques de 1 et 2%, différents ratios massiques β lg/Glob, force ionique de 5 et 100 mM NaCl) et son apport positif ou négatif pour la conception d'un nouveau système alimentaire.

Cette étude a été développée en deux étapes principales. La première reposait sur la thermodénaturation des protéines en système semi-dilué à différentes forces ioniques permettant la formulation d'agrégats mixtes solubles présentant de nouvelles propriétés méso-structurales. La deuxième partie concernait la préparation de gels mixtes acides élaborés à partir des agrégats thermiques mixtes ou de mélanges d'agrégats obtenus séparément. Les propriétés mécaniques et structurales des différents gels acides formés ont été étudiées par différents outils analytiques biochimiques et physicochimiques.

Afin de mener à bien ce projet, il a été indispensable, dans un premier temps, d'obtenir des matières premières (β lg et Glob) de qualité en quantité suffisante pour couvrir nos besoins durant cette étude. Deux protocoles ont été utilisés pour l'extraction et la purification de ces protéines.

Les Glob de pois ont été obtenues par extraction au pH isoélectrique (pH 4,9) suivie d'une extraction alcaline (pH 8). Une purification par ultrafiltration/diafiltration a été effectuée en utilisant une cassette avec un seuil de séparation de 10 kDa. La solution protéique diafiltrée a ensuite été lyophilisée afin d'obtenir une poudre « pure » de Glob. Plusieurs caractérisations physicochimiques et chimiques sur ces fractions pures de Glob ont été effectuées notamment la pureté, la solubilité, l'hydrophobicité de surface, les paramètres thermiques ainsi que les rendements d'extraction. Ces différentes analyses ont notamment démontré que les traitements d'extraction avaient peu d'impact sur la structure des protéines et donc permettaient de conserver les protéines sous leurs formes natives.

Concernant la β lg, celle-ci a été purifiée par une précipitation sélective en utilisant le l'acide trichloracétique (TCA), suivi d'une diafiltration à l'aide d'une membrane de dialyse de 10 kDa. La caractérisation physicochimique par SDS-PAGE montre l'obtention de fractions

pures, et l'élimination de toutes autres fractions protéiques sériques. Le rendement d'extraction est satisfaisant ; la solubilité et les paramètres thermiques obtenus montrent que la β lg est sous sa forme native.

Avant de s'intéresser aux systèmes mixtes agrégés, il était nécessaire de caractériser les fractions natives (β lg et de Glob) en fonction de la force ionique fixée (5 et 100 mM NaCl) dans cette étude. Quelque soit la force ionique utilisée les caractéristiques physicochimiques des protéines natives ne sont pas impactées à l'exception de l'augmentation de leur stabilité thermique. Suite à la détermination de la concentration minimale de gélification thermique des deux protéines à différentes forces ioniques (5 et 100 mM NaCl), nous avons choisi de former des agrégats solubles à partir de concentrations protéiques de 1 et 2% (m/m).

Le traitement thermique (1 h à 85 °C) des mélanges à différents ratios massiques β lg/Glob pour une concentration protéique de 1 ou 2% a généré des agrégats thermiques solubles (non-sédimentables) avec un taux de conversion d'au moins 98% à force ionique faible (5 mM NaCl). A force ionique plus élevée (100 mM NaCl), le taux d'agrégats solubles restait élevé (98%) pour la concentration protéique de 1%. Par contre, à une concentration protéique de 2%, le taux d'agrégats était de 22 et 65% pour les agrégats de β lg et Glob seuls respectivement. Le taux de conversion en agrégats mixtes solubles diminue drastiquement en fonction de l'augmentation de la proportion de β lg dans les mélanges à 100 mM NaCl, accompagnée d'une forte précipitation des protéines sous forme de culots (agrégats sédimentables).

La participation des interactions hydrophobes entre les deux protéines a été mise en évidence. L'augmentation de ce type d'interactions est dépendante de la concentration protéique, de la part massique de β lg dans les mélanges et de la force ionique. Ces interactions étaient plus marquées pour les agrégats de β lg que pour les agrégats de Glob de pois.

La méthode d'Ellman a été mise en œuvre pour déterminer la teneur des agrégats de β lg et de Glob en groupements S⁻ et SS. L'augmentation des réactions S⁻/SS dans les mélanges thermisés est dépendante de la concentration protéique, de la fraction massique de β lg dans les mélanges à force ionique faible (5 mM en NaCl).

L'analyse de la charge de surface des mélanges d'agrégats a également été effectuée par zétamètre. Il est important de noter que celle-ci est dépendante de la concentration

protéique, de la part de β lg dans les mélanges et également de la force ionique. Les mesures du potentiel Zeta (ζ) des agrégats révèlent que les agrégats de Glob possèdent une charge apparente proche du seuil d'agrégation contrairement aux agrégats de β lg qui présentent une charge proche du seuil de dispersion. On observe que la β lg s'agrège fortement (notamment à 100 mM NaCl) contrairement à la Glob. Les observations révèlent aussi la formation de macro-agrégats non sédimentables pour la Glob à 5 mM NaCl, et sédimentables à 100 mM NaCl. L'étude des propriétés thermiques des agrégats mixtes a permis de mettre en évidence l'augmentation de la stabilité thermique des Glob en fonction de la diminution de l'apport de β lg dans les mélanges et de l'augmentation de la force ionique.

Conformément aux objectifs fixés, cette étude nous a permis de confirmer la nature des interactions intermoléculaires impliquées dans la formation des agrégats individuels de Glob, de β lg ainsi que les agrégats mixtes. A faible force ionique (5 mM en NaCl) les agrégats de β lg se forment principalement par des liaisons covalentes, tandis qu'à une force ionique élevée (100 mM en NaCl), le comportement d'agrégation est favorisé par des interactions hydrophobes. Cependant la formation des agrégats de Glob (dans la gamme de concentration étudiée) est favorisée principalement par des liaisons non covalentes (hydrophobes). La thermodénaturation des mélanges protéiques a permis de générer des agrégats mixtes associés à la fois par des interactions hydrophobes et vraisemblablement par greffage covalent (échanges S⁻/SS) entre la β lg et les sous-unités de Glob contenant des résidus cystéine. Les sous-unités de Glob dépourvue de cystéine s'associeraient via des liaisons hydrophobes avec la β lg. L'agrégation mixte est aussi accélérée avec l'ajout de sel par effet d'écrantage des charges, favorisant l'existence d'interactions hydrophobes. Il est important de noter que l'intensité des interactions intermoléculaires est favorisée à des concentrations protéiques de 2% pour les deux conditions de force ionique.

Les résultats obtenus par DLS ont mis en évidence un diamètre moyen important, et une distribution de taille bimodale pour les agrégats de Glob (~150 et 208 nm respectivement à 5 et 100 mM NaCl). Par contre, les agrégats de β lg présentent un diamètre moyen plus faible (~40 et 130 nm respectivement à 5 et 100 mM NaCl) et une distribution monomodale. A 5 mM NaCl, les agrégats de β lg possèdent un poids moléculaire élevé (8000 kDa >M_w>>2000 kDa) et un diamètre réduit. En revanche, le poids moléculaires des agrégats de Glob mesurés par SEC-HPLC était faible (2000 kDa >> M_w>600 kDa). Cette différence est vraisemblablement due à l'élimination des agrégats de hauts poids moléculaire lors de la filtration avant injection de la Glob dans la colonne de SEC-HPLC. Ceci confirme bien le rôle

crucial des liaisons covalentes dans le maintien et la réticulation de la structure des agrégats engendrant la diminution de leur taille notamment pour les agrégats de β lg. Cet effet n'a pas été remarqué pour les agrégats de Glob à cause de leur faible teneur en cystéine. Par ailleurs, la taille et le poids moléculaire des agrégats sont dépendants de la force ionique et du type d'interactions intermoléculaire dominant dans le système. A une force ionique élevée, la diminution des répulsions électrostatiques aboutit à l'augmentation des interactions hydrophobes conduisant à la formation de macro-agrégats sédimentables et non sédimentables caractérisés par une taille importante et un poids moléculaire très élevé (~ 8000 kDa).

Notre travail a également mis en évidence que la thermodénaturation des protéines à une force ionique faible (notamment à 5 mM NaCl) ainsi que l'apport de β lg dans les mélanges permet d'obtenir des agrégats protéiques mixtes de taille réduite et de haut poids moléculaire. L'implication des réactions d'échanges S⁻/SS entre les deux protéines empêche l'agrégation aléatoire et la formation de macro-agrégats de Glob. Ces résultats sembleraient indiquer que les caractéristiques méso-structurales des agrégats mixtes seraient contrôlées par la présence de β lg dans les mélanges.

Nous avons également confirmé que la composition des agrégats mixtes par fractionnement et collecte des éluats correspondant aux différentes fractions obtenues en SEC-HPLC. Ces résultats indiquent que les agrégats de hauts poids moléculaires ($8000 \text{ kDa} > M_w > 2000 \text{ kDa}$) sont composés de β lg et les sous-unités de Glob. La composition et le poids moléculaire des agrégats intermédiaires augmentent proportionnellement à l'augmentation de la part massique de β lg dans les mélanges. La formation des agrégats mixtes n'exclut pas l'éventualité de la formation et la coexistence d'agrégats purs de chaque protéine de taille identique. La formation des agrégats mixtes à 100 mM NaCl ne présente pas une bonne alternative pour la suite de nos travaux au vu de la taille et du poids moléculaire des agrégats formés, ainsi qu'en raison de la quantité de matière protéique perdue lors de la récupération des agrégats solubles. Face à cette constatation, la force ionique de 5 mM NaCl a été retenue pour la suite de notre étude.

Ces différentes expériences suggèrent donc une nouvelle stratégie pour la production et la formulation d'agrégats solubles à partir de protéines de pois renforcée par la β lg avec des propriétés méso-structurales contrôlées.

Le deuxième enjeu de la thèse était l'étude de la gélification à froid par l'ajout de GDL *in situ*. Il a été envisagé dans cette partie une gélification à 25 °C des mélanges d'agrégats

protéiques obtenus selon deux voies de préparation : des agrégats mixtes résultant des protéines chauffées en mélange (voie1), et des mélanges d'agrégats des deux protéines obtenus séparément (voie2), dans les mêmes conditions opératoires et à une concentration initiale identique en protéine. Le travail présenté visait à étudier les propriétés viscoélastiques des gels formés, ainsi qu'à caractériser leur microstructure en fonction du ratio massique β lg/Glob et selon le mode de préparation (voie 1 et voie 2).

Avant de s'intéresser aux propriétés rhéologiques des systèmes gélifiés, il était indispensable de déterminer les seuils de concentration distinguant les domaines de gélification thermique et acide. Les valeurs de concentrations minimales de gélification thermique obtenues ($C_{g_{th}}$) étaient de 5% et 7% pour β lg et Glob respectivement. En dessous de ces concentrations, différents diagrammes sol/gel_{thermique} pour les mélanges de protéines natives et sol/gel_{acide} pour les agrégats de β lg/Glob préparés selon les voies 1 et 2, ont été établis. Au cours de l'acidification, la formation d'un réseau tridimensionnel apparaît à partir d'une concentration de 2% pour les agrégats de β lg, et 3% pour les agrégats de Glob. En dessous de ces concentrations seuils, l'acidification provoque la formation d'amas macroscopiques qui tendaient à précipiter. Nos résultats montrent clairement, que la formation des systèmes mixtes gélifiés est dépendante de la concentration protéique et non du type de mélange réalisé (voie 1 ou voie 2). Pour tous les gels mixtes, l'augmentation de la fraction massique de β lg dans les mélanges conduit à une diminution de la concentration minimale de gélification acide (C_{g_a}) des gels mixtes par rapport à la C_{g_a} de Glob. Pour la suite de l'étude, nous avons choisi de travailler dans un domaine au-dessus de la C_{g_a} des deux protéines, soit à une concentration protéique initiale de 4 et 4,5% et à différents ratios massiques β lg/Glob.

Dans un premier temps, nous avons suivi le profil de gélification des protéines en fonction du temps et de l'abaissement de pH, dans le but de comparer le comportement individuel de gélification de chaque type d'agrégat protéique. Il est apparu que le point de gélification est trois fois plus rapide dans le cas des agrégats de Glob (à pH 6,4) que dans le cas des agrégats de β lg (à pH 5,6). Ce comportement peut être attribué aux propriétés de surface différentes entre agrégats (charge, hydrophobie...) et à la taille plus importants des agrégats thermiques. Concernant la gélification des agrégats mixtes, nous avons mis en évidence que quelque soit le mode de préparation des agrégats, le profil d'acidification des mélanges (β lg/Glob) est proche de celui des agrégats majoritaires dans les systèmes mixtes.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence les propriétés structurales des gels acides de β lg, de Glob et des gels acides mixtes formés selon les deux modes de préparation (voies 1 et 2) des agrégats. Cette phase a nécessité la mise en œuvre de différentes techniques, classiques pour une caractérisation multi-échelle. Cette caractérisation est basée sur l'évaluation des propriétés mécaniques des systèmes protéiques notamment de leurs propriétés viscoélastiques et de l'observation de leur microstructure.

Dans la gamme de concentration étudiée, la gélification acide de β lg a donné lieu à des gels viscoélastiques plus forts que les autres systèmes avec des propriétés mécaniques se rapprochant des gels chimiques, reflétant la formation d'un réseau continu et d'une structure fibrillaire ordonnée assez resserrée. Celle-ci était donc peu poreuse et les gels possédaient une capacité de rétention de l'eau élevée. Ces caractéristiques sont attribuées à l'augmentation des interactions protéine-protéine lors de l'acidification, mais aussi lors de la formation préalable des agrégats de β lg de structure compacte et dense, du fait notamment de l'implication de liaisons covalentes de type SS.

Dans notre étude, les agrégats de Glob sont capables de s'auto-assembler pour former un réseau de gel après l'ajout de GDL. Nous avons démontré qu'avec de faibles concentrations protéiques engagées, la rigidité (le module G') des gels étaient élevée par rapport à ceux indiqués dans la littérature. Cela dû est probablement au ratio viciline/légumine élevé, favorable à la structure et donc à la rigidité de ces gels. Toutefois, nos résultats ont aussi mis en évidence que le gel acide de Glob est caractéristique d'un gel physique viscoélastique avec une élasticité plus faible que celle des gels de β lg. Le réseau de ce gel est moins homogène avec une structure fibrillaire plus grossière, moins ordonnée et plus poreuse, ce qui explique le comportement rhéologique différent par rapport à celui de β lg. La qualité moindre des gels à base de globulines de pois correspond à l'association de macro-agrégats formés via des interactions intermoléculaires hydrophobes lors de l'agrégation thermique, ainsi qu'à la gélification plus rapide de ces particules protéiques au cours de l'acidification conduisant à une structuration plus désordonnée.

L'étude de la gélification des différents systèmes protéiques mixtes, a mis en évidence que l'incorporation de β lg avec des ratios massiques différents, modifiait positivement les propriétés mécaniques et structurales des gels mixtes par rapport aux gels de Glob quelque soit la voie de préparation de ces agrégats, avec un effet plus marqué pour les gels mixtes élaborés selon la voie 1 (agrégats issus des 2 protéines chauffées en mélange).

Dans les gels mixtes élaborés selon la voie 1, la présence de β lg dans les mélanges améliore nettement la rigidité du gel (G') supérieure à celle des gels de Glob, mais inférieure aux gels de β lg. La structure de ces gels mixtes devient moins grossière et moins poreuse avec une capacité de rétention d'eau améliorée par rapport au cas des gels de Glob purs. Ces effets peuvent être attribués en grande partie aux propriétés méso-structurales des agrégats mixtes contrôlées par des interactions intermoléculaires covalentes sous l'effet de la β lg.

Par ailleurs, les gels mixtes élaborés à partir de mélanges d'agrégats des deux protéines générés séparément (voie 2), présentent des valeurs de module élastique finales comparables à celles mesurées sur les systèmes préparés selon la voie 1. Néanmoins, pour tous les ratios β lg/Glob les spectres mécaniques présentaient des profils similaires à celui du gel acide de Glob seules avec une dépendance à la fréquence bien marquée. Ceci indique des propriétés mécaniques caractéristiques de gels mixtes plus faibles avec une forte instabilité des points de jonction au sein du réseau de gel. En effet, la microstructure de ces gels mixtes issus de mélanges d'agrégats des deux protéines présentait un réseau moins dense et de structure plus poreuse par rapport aux systèmes mixtes étudiés précédemment, et assez semblable au gel formé d'agrégats purs de Glob. Ainsi, la capacité de rétention d'eau de ces gels était plus faible que celle des gels élaborés selon la voie 1. La différence notable entre la microstructure des différents gels mixtes élaborés selon les deux voies de préparation des agrégats, peut être expliqué par la structure des agrégats à l'origine de ces gels. L'obtention d'agrégats mixtes de taille et de composition plus homogène (et probablement réticulé en partie) que dans le cas des mélanges d'agrégats des deux protéines obtenus séparément, est favorable à la formation d'un réseau de gel plus régulier dont les caractéristiques se rapprochent du gel pur de β lg. Lorsque les agrégats ont été préparés séparément puis mélangés, la formation des gels semble gouvernée par les agrégats de Glob et les propriétés de ces gels (microstructure, modules viscoélastiques, comportement mécanique, capacité de rétention d'eau) s'apparentent aux gels purs de Glob.

L'ensemble de cette étude montre que l'on peut tirer profit de l'association entre globulines de pois et protéines de lactosérum par l'obtention d'agrégats mixtes, qui sans véritablement créer de synergie permet de compenser les aptitudes moindres des agrégats purs de Glob à la gélification acide.

II. Perspectives

Cette étude a contribué à la compréhension des mécanismes d'interaction dans la formation d'agrégats mixtes entre globulines de pois et β -lactoglobuline ; les propriétés méso-structurales des agrégats sont fortement modulées par la présence de β lg, et les caractéristiques des gels acides formés consécutivement sont nettement améliorées par rapport aux gels acides purs de Glob. Néanmoins, d'un point de vue de la connaissance de ces systèmes, de nombreux points pourraient être complétés.

En effet, nous avons utilisé des techniques de caractérisation pour mesurer la taille moléculaire des agrégats protéiques formés (DLS et SEC-HPLC) qui ne permettent pas de caractériser la forme des particules et assimilent plutôt celles-ci à des sphères. Pourtant, nous avons montré la formation de gels acides filamenteux, ce qui suppose plutôt la formation préalable d'agrégats de type fibrillaire. Il serait donc intéressant d'approfondir la question de la morphologie des agrégats par des techniques telles que la Microscopie Electronique à Transmission (MET) ou la Microscopie à Force Atomique (AFM), qui permettent d'accéder au niveau d'échelle souhaité. De plus, l'estimation du poids moléculaire des agrégats par la SEC-HPLC était limitée par la disponibilité des marqueurs de calibration de haut poids moléculaire supérieure à 2000 kDa (Blue dextran). La taille, le poids moléculaire et la densité des agrégats pourraient être mieux caractérisés par HPLC-SEC-MALLS. Cette technique semble aussi capable de fournir des informations complémentaires et précises sur les facteurs de forme.

De façon tout à fait complémentaire, une analyse d'image appliquée aux acquisitions microscopiques de MCBL réalisée sur les gels, aurait permis de fournir une analyse plus discriminante et objective de la microstructure des gels.

Par ailleurs, dans nos travaux concernant la caractérisation des agrégats et des interactions moléculaires nous n'avons pas tenu compte de l'aspect cinétique de la mise en place de ces interactions et de la constitution des particules protéiques. Même si la dénaturation des protéines semble coopérative à l'échelle macroscopique, il n'est pas sûr que, en mélange, la dénaturation de la protéine sérique suive la même cinétique de dénaturation que celle des protéines de pois (pouvant présenter elles-mêmes des différences par exemple entre légumineuses et vicilines). Des mesures réalisées à des températures intermédiaires entre 70 et 85 °C et à différents temps de chauffage par exemple pourraient donner des informations

utiles. Par exemple, il peut être imaginé de suivre la taille des agrégats par DLS de manière dynamique avec des systèmes qui permettent de chauffer *in situ*.

Ensuite, nous avons utilisé la protéine majoritaire du lactosérum dans cette étude, et il serait intéressant de valider le comportement d'agrégation et de formation des gels acides mixtes lorsqu'un isolat de protéines de lactosérum est utilisé à la place de β lg seule.

De façon plus générale, le comportement d'agrégation/gélification des globulines de pois associées à d'autres sources protéiques comme les protéines d'œufs ou comme d'autres protéines végétales, qui pourraient avoir des caractéristiques proches de celles de la β lg (protéines globulaires de petites taille riches en cystéine). Par exemple, l'ovalbumine d'œuf, les albumines végétales (également présentes dans le pois) ou les protéines de pomme de terre pourraient être de bons candidats.

Au plan applicatif, la gélification acide par ajout de ferment lactique pourrait être étudiée en préalable du développement de nouveaux produits alimentaires lacto-fermentés. Cela ouvrirait un champ d'application à des produits fermentés où les protéines de pois peuvent concurrencer partiellement ou totalement les protéines laitières ou les protéines de soja.

Ensuite, d'un point de vue nutritionnel, il serait d'abord intéressant de mesurer la digestibilité des protéines à partir de ces systèmes mixtes (agrégats ou gels) et d'évaluer leur susceptibilité aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal. Par ailleurs, si l'allergénicité des protéines sériques et en particulier de la β -lactoglobuline n'est pas discutable, il serait intéressant de mesurer le pouvoir allergène de ces agrégats mixtes fonctionnalisés par le traitement thermique.

Enfin, dans le but de développer une multitude d'applications alimentaires de ces mélanges en tant qu'ingrédients, il serait intéressant d'étudier d'autres propriétés fonctionnelles comme la gélification thermique, comme les propriétés émulsifiantes, moussantes et la capacité d'encapsulation de ces systèmes.

Références bibliographiques

- Adler-Nissen, J., Olsen, H. S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein, *Am chem*, 92 (1), 125-146.
- Aguilera, J. M., Kessler, H.-G. (1989). Properties of Mixed and Filled-type Dairy Gels. *Journal of Food Science*, 54(5), 1213-1217.
- Alizadeh-Pasdar, N., Li-Chan, E. C. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 328-334.
- Alting, A. C., de Jongh, H. H., Visschers, R. W., Simons, J.-W. F. (2002). Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4682-4689.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., Paques, M., Visschers, R. W. (2003). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 469-479.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., Visschers, R. W. (2000). Formation of Disulfide Bonds in Acid-Induced Gels of Preheated Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5001-5007.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., Visschers, R. W. (2003). Cold-Set Globular Protein Gels: Interactions, Structure and Rheology as a Function of Protein Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3150-3156.
- Alting, A. C., Weijers, M., de Hoog, E. H. A., van de Pijpekamp, A. M., Cohen Stuart, M. A., Hamer, R. J., et al. (2004). Acid-Induced Cold Gelation of Globular Proteins: Effects of Protein Aggregate Characteristics and Disulfide Bonding on Rheological Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 623-631.
- AOAC. Official methods of analysis. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists International; 1990.
- Aymard, P., Durand, D., Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(3), 213-221.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., Ristic, N., (2010). Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences* 11(12), 4973.
- Barron, J., Karlberg, L., Rockström, J. (2007). Water pressure and increases in food; bioenergy demand implications of economic growth and options for decoupling.

- Bauer, R., Hansen, S., Øgendal, L. (1998). Detection of intermediate oligomers, important for the formation of heat aggregates of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 8(2), 105-112.
- Baussay, K., Bon, C. L., Nicolai, T., Durand, D., Busnel, J.-P. (2004). Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein β -lactoglobulin at pH 7. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2), 21-28.
- Beliciu, C. M., Moraru, C. I. (2011). The effect of protein concentration and heat treatment temperature on micellar casein-soy protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1448-1460.
- Beliciu, C. M., Moraru, C. I. (2013). Physico-chemical changes in heat treated micellar casein – Soy protein mixtures. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 469-476.
- Bergh, H. (1952). Determination of the amino acids, cystine, methionine, tyrosine, and tryptophane in animal and vegetable materials. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2(1), 158-172.
- Bouhallab, S., Henry, G., Caussin, F., Croguennec, T., Fauquant, J., Mollé, D. (2004). Copper-catalyzed formation of disulfide-linked dimer of bovine β -lactoglobulin. *Le Lait*, 84(6), 517-525.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food research international*, 43(2), 414-431.
- Britten, M., Giroux, H. J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 609-617.
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., et al. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution — still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481-495.
- Bryant, C., McClements, D. (2000). Optimizing preparation conditions for heat-denatured whey protein solutions to be used as cold-gelling ingredients. *Journal of Food Science*, 65(2), 259-263.
- Bryant, C. M., McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 143-151.

- Campbell, L. J., Gu, X., Dewar, S. J., Euston, S. R. (2009). Effects of heat treatment and glucono- δ -lactone-induced acidification on characteristics of soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 344-351.
- Casey, R. (1979). Immunoaffinity chromatography as a means of purifying legumin from *Pisum* (pea) seeds. *Biochemical Journal*, 177(2), 509-520.
- Casey, R., March, J., Sharman, J., Short, M. (1981). The purification, N-terminal amino acid sequence and some other properties of an α M-subunit of legumin from the pea (*Pisum sativum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 670(3), 428-432.
- Casey, R., Sharman, J. E., Wright, D. J., Bacon, J. R., Guldager, P. (1982). Quantitative variability in *Pisum* seed globulins: its assessment and significance. *Plant Foods for Human Nutrition*, 31(4), 333-346.
- Cavallieri, A. L. F., Costa-Netto, A. P., Menossi, M., Da Cunha, R. L. (2007). Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values. *Le Lait*, 87(6), 535-554.
- Cavallieri, A. L. F., da Cunha, R. L. (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 439-448.
- Cayot, P., Lorient, D. (1998). Structure and technical properties of milk proteins: Technique et Documentation Lavoisier.
- Chaplin, L. C., Lyster, R. L. (1986). Irreversible heat denaturation of bovine α -lactalbumin. *Journal of Dairy Research*, 53(2), 249-258.
- Chaumet, J., Delpeuch, F., Dorin, B., Gherzi, G., Hubert, B., Le Cotty, T., et al. (2009). Agrimonde: Agricultures et alimentations du monde en 2050: scénarios et défis pour un développement durable. INRA, CIRAD, 205.
- Choi, S.-M., Ma, C.-Y. (2006). Study of Thermal Aggregation of Globulin from Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Size-Exclusion Chromatography and Laser Light Scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 554-561.
- Clark, A., Kavanagh, G., Ross-Murphy, S. (2001). Globular protein gelation—theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 383-400.
- Clark, A., Ross-Murphy, S. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels Biopolymers. Springer Berlin Heidelberg, 83(1), 57-192
- Creamer, L. K., Bienvenue, A., Nilsson, H., Paulsson, M., van Wanroij, M., Lowe, E. K., et al. (2004). Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. 1. Bovine β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7660-7668.

1. Creamer, L. K., Parry, D. A. D., Malcolm, G. N. (1983). Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. Archives of biochemistry and biophysics, 227(1), 98-105.
2. Creighton, T. E. (1993). Proteins: structures and molecular properties: 547.96 CRE. Macmillan.
3. Créviu, I., Berot, S., Gueguen, J. (1996). Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. Food/Nahrung, 40(5), 237-244.
4. Croy, R., Gatehouse, J., Tyler, M., Boulter, D. (1980). 1. The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.). The Biochemical journal, 191(2), 509-516.
5. Croy, R. D., Gatehouse, J., Evans, I. M., Boulter, D. (1980). 2. Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (*Pisum sativum* L.). Planta, 148(1), 49-56.
6. Croy, R.R., Hoque, M.S., Gatehouse, J.A., Boulter, D., (1984). The major albumin proteins from pea (*Pisum sativum* L). Purification and some properties. Biochemical journal, 218(3), 795-803.
7. Damodaran, S., (1996). Functional properties. Food proteins: Properties and characterization, pp. 167-234.
8. De Wit, J. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. Journal of Dairy Science, 81(3), 597-608.
9. De Wit, J., Van Kessel, T. (1996). Effects of ionic strength on the solubility of whey protein products. A colloid chemical approach. Food Hydrocolloids, 10(2), 143-149.
10. De Wit, J. N. (2009). Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. a review. Trends in Food Science & Technology, 20(1), 27-34.
11. De Wit, J. N., Swinkels, G. A. M. (1980). A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin Thermal behaviour at temperatures up to 100°C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 624(1), 40-50.
12. Deng, Q., Wang, L., Wei, F., Xie, B., Huang, F., Huang, W., et al. (2011). Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. Food Chemistry, 124(4), 1458-1465.
13. Derbshyre, E., Wright, D., Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin storage proteins of legume seed. Phytochemistry, 15, 3-24.
14. Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., Rouvet, M. (2009). Mechanism of formation of stable heat-induced β -lactoglobulin microgels. International Dairy Journal, 19(5), 295-306.

- Durand, D., Gimel, J. C., Nicolai, T. (2002). Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 304(1), 253-265.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.
- Fang, Y., Zhang, B., Wei, Y., Li, S. (2013). Effects of specific mechanical energy on soy protein aggregation during extrusion process studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 220-225.
- Firoozmand, H., Rousseau, D. (2015). Microstructure and rheology design in protein–protein–polysaccharide composites. *Food Hydrocolloids*, 50, 84-93.
- Fox, K., Holsinger, V., Posati, L., Pallansch, M. (1967). Separation of β -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid. *Journal of Dairy Science*, 50(9), 1363-1367.
- Fox, P. (2003). Milk proteins: general and historical aspects *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins* (pp. 1-48): Springer.
- Friedman, M. (1973). Chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins.
- Fuhrmeister, H., Meuser, F. (2003). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *Journal of Food Engineering*, 56(2), 119-129.
- Funtenberger, S., Dumay, E., Cheftel, J. (1997). High pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/SS interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 912-921.
- Funtenberger, S., Dumay, E., Cheftel, J. C. (1995). Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *LWT - Food Science and Technology*, 28(4), 410-418.
- Galani, D. (1999). Heat-induced denaturation and aggregation of β -Lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *International journal of food science & technology*, 34(5-6), 467-476.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R., Boulter, D. (1980). Isoelectric-focusing properties and carbohydrate content of pea (*Pisum sativum*) legumin. *Biochemical Journal*, 185, 497-503.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Morton, H., Tyler, M., Boulter, D. (1981). Characterisation and Subunit Structures of the Vicilin Storage Proteins of Pea (*Pisum sativum* L.). *European Journal of Biochemistry*, 118(3), 627-633.

- Gatehouse, J. A., Lycett, G., Croy, R., Boulter, D. (1982). The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemical Journal*, 207, 629-632.
- Gatehouse, J.A., Gilroy, J., Hoque, M.S., Croy, R.R., (1985). Purification, properties and amino acid sequence of a low-Mr abundant seed protein from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemical Journal* 225, 239-247.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Voilley, A. (2012). Pea (*Pisum sativum*, L.) protein isolate stabilized emulsions: a novel system for microencapsulation of lipophilic ingredients by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2211-2221.
- Gordon, W. G., Basch, J. J., Kalan, E. B. (1961). Amino acid composition of β -lactoglobulins A, B, and AB. *Journal of Biological Chemistry*, 236(11), 2908-2911.
- Gueguen, J. (1983). Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. *Plant Food Human Nutrition*, 32(3-4), 267-303.
- Gueguen, J. (1989). Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1236-1241.
- Gueguen, J., Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42(3), 209-224.
- Gueguen, J., Chevalier, M., And, J. B., Schaeffer, F. (1988). Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 167-182.
- Gueguen, J., Vu, A. T., Schaeffer, F. (1984). Large scale purification and characterisation of pea globulins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(9), 1024-1033.
- Guo, F., Xiong, Y. L., Qin, F., Jian, H., Huang, X., Chen, J. (2015). Surface Properties of Heat Induced Soluble Soy Protein Aggregates of Different Molecular Masses. *Journal of Food Science*, 80(2), C279-C287.
- Guyomarc'h, F., Nono, M., Nicolai, T., Durand, D. (2009). Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1103-1110.
- Guyomarc'h, F., Queguiner, C., Law, A. J. R., Horne, D. S., Dalgleish, D. G. (2003). Role of the Soluble and Micelle-Bound Heat-Induced Protein Aggregates on Network Formation in Acid Skim Milk Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7743-7750.
- Hambling, S. G., McAlpine, A. S., Sawyer, L., Fox, P. (1992). β -Lactoglobulin. *Advanced dairy chemistry-1: Proteins*.(Ed. 2), 141-190.

- Haskard, C. A., Li-Chan, E. C. Y. (1998). Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS) Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2671-2677.
- Hayakawa, S., Nakai, S. (1985). Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. *Journal of Food Science*, 50(2), 486-491.
- Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G., Legger, A., Gruppen, H., van Boekel, T., et al. (2006). Bitterness of saponins and their content in dry peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8), 1225-1231.
- Higgins, T., Chandler, P., Randall, P., Spencer, D., Beach, L., Blagrove, R., et al. (1986). Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 261(24), 11124-11130.
- Hoffmann, M. A. M., van Mil, P. J. J. M. (1997). Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2942-2948.
- Hoffmann, M. A. M., van Mil, P. J. J. M. (1999). Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin as a Function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 1898-1905.
- Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(20), 2923-2950.
- Hongsprabhas, P., Barbut, S., Marangoni, A. G. (1999). The Structure of Cold-Set Whey Protein Isolate Gels Prepared With Ca^{++} . *LWT - Food Science and Technology*, 32(4), 196-202.
- Howell, N. (1994). Elucidation of protein-protein interactions in gels and foams. *Gums and stabilisers for the food industry*, 7, 77-89.
- Hudson, H., Daubert, C., Foegeding, E. (2000). Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3112-3119.
- Hunter, R. (1986). Transport properties of suspensions. *Foundation of Colloid Science*, 1, 494-536.
- Jeyarajah, S., Allen, J. C. (1994). Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 80-85.

- Ju, Z. Y., Kilara, A. (1998). Effects of Preheating on Properties of Aggregates and of Cold-Set Gels of Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3604-3608.
- Karaca, A. C., Low, N., Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food research international*, 44(9), 2742-2750.
- Kato, A., Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 624(1), 13-20.
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., Utsumi, S. (2008). Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybean - French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10273-10279.
- Kinsella, J. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. *Food proteins*/edited by PF Fox and JJ Condon.
- Kinsella, J., Whitehead, D. (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv Food Nutr Res*, 33(C), 343-438.
- Kolar, C. W., Cho, I. C., Watrous, W. L. (1979). Vegetable protein application in yogurt, coffee creamers and whip toppings. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 389-391.
- Konrad, G., Lieske, B., Faber, W. (2000). A large-scale isolation of native β -lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. *International Dairy Journal*, 10(10), 713-721.
- Koyoro, H., Powers, J. (1987). Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chem*, 64(2), 97.
- Kunugi, S., Tanaka, N. (2002). Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1), 329-344.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lakemond, C. M., de Jongh, H. H., Helsing, M., Gruppen, H., Voragen, A. G. (2000). Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 1991-1995.

- Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D. (1999). Kinetics of Aggregation and Gelation of Globular Proteins after Heat-Induced Denaturation. *Macromolecules*, 32(19), 6120-6127.
- Li, F., Kong, X., Zhang, C., Hua, Y. (2011). Rheological properties and permeability of soy protein-stabilised emulsion gels made by acidification with glucono- δ -lactone. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2186-2191.
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., Cui, S. (2007). Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chemistry*, 104(4), 1410-1417.
- Liang, H.-N., Tang, C.-H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309-319.
- Liang, H.-N., Tang, C.-h. (2014). Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 463-469.
- Line, V. L. S., Remondetto, G. E., Subirade, M. (2005). Cold gelation of β -lactoglobulin oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 269-278.
- Liu, T. X., Relkin, P., Launay, B. (1994). Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta*, 246(2), 387-403.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 275-279.
- Ma, C.-Y., Harwalkar, V. (1991). Thermal analysis of food proteins. *Advances in food and nutrition research*, 35, 317-366.
- Malhotra, A., Coupland, J. N. (2004). The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 101-108.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., Subirade, M. (2005). Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects. *Journal of Food Science*, 70(1), C67-C73.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., Yada, R. Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chemistry*, 63(2), 265-274.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., Yada, R. Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, 62(1), 27-47.

- Matta, N. K., Gatehouse, J. A., Boulter, D. (1981). Molecular and subunit heterogeneity of legumin of *Pisum sativum* L.(garden pea)—a multi-dimensional gel electrophoretic study. *Journal of Experimental Botany*, 32(6), 1295-1307.
- McClements, D. J., Keogh, M. K. (1995). Physical properties of cold-setting gels formed from heat-denatured whey protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(1), 7-14.
- McKenzie, H., Ralston, G., Shaw, D. (1972). Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine. beta.-lactoglobulins and effects of urea. *Biochemistry*, 11(24), 4539-4547.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D. (2008). Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 129-135.
- Mession, J. L., Assifaoui, A., Cayot, P., Saurel, R. (2012). Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 335-346.
- Mession, J. L., Assifaoui, A., Lafarge, C., Saurel, R., Cayot, P. (2012). Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins–sodium alginate–water ternary system. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 333-343.
- Mession, J.-L., Blanchard, C., Mint-Dah, F.-V., Lafarge, C., Assifaoui, A., Saurel, R. (2013). The effects of sodium alginate and calcium levels on pea proteins cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 446-457.
- Mession, J.-L., Chihi, M. L., Sok, N., Saurel, R. (2015). Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 46(0), 233-243.
- Mession, J.-L., Roustel, S., Saurel, R. (2015). Interactions in casein micelle-pea protein system (Part I): Heat-induced denaturation and aggregation. *Food Hydrocolloids*.
- Mession, J.-L., Sok, N., Assifaoui, A., Saurel, R. (2013). Thermal Denaturation of Pea Globulins (*Pisum sativum* L.)—Molecular Interactions Leading to Heat-Induced Protein Aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1196-1204.
- Mori, T., Nakamura, T., Utsumi, S. (1982). Gelation Mechanism of Soybean 11S Globulin: Formation of Soluble Aggregates as Transient Intermediates. *Journal of Food Science*, 47(1), 26-30.
- Mounsey, J. S., O’Kennedy, B. T. (2007). Conditions limiting the influence of thiol–disulphide interchange reactions on the heat-induced aggregation kinetics of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 17(9), 1034-1042.

- Munialo, C. D., Martin, A. H., van der Linden, E., de Jongh, H. H. (2014). Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(11), 2418-2427.
- Murekatete, N., Hua, Y., Chamba, M. V. M., Djakpo, O., Zhang, C. (2014). Gelation Behavior and Rheological Properties of Salt- or Acid-Induced Soy Proteins Soft Tofu-Type Gels. *Journal of Texture Studies*, 45(1), 62-73.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., Man, Y. B. C. (1999). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, 67(4), 435-443.
- Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 676-683.
- Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C. (2011). β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945-1962.
- Nicolai, T., Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 249-256.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301-318.
- O'Kane, F. E. (2004). Molecular characterisation and heat-induced gelation of pea vicilin and legumin. Ph. D. Dissertation.
- O'Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., van Boekel, M. A. (2004). Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3149-3154.
- O'Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J. S. (2004). Characterization of Pea Vicilin. 1. Denoting Convicilin as the α -Subunit of the Pisum Vicilin Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3141-3148.
- O'Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J. S. (2004). Heat-Induced Gelation of Pea Legumin: Comparison with Soybean Glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5071-5078.

- O'Kane, F. E., Vereijken, J. M., Gruppen, H., Boekel, M. A. (2005). Gelation behavior of protein isolates extracted from 5 cultivars of *Pisum sativum* L. *Journal of Food Science*, 70(2), C132-C137.
- Osborne, T. (1924). *The vegetables proteins* 2nd edition: Longmans, Green & Co edition London, England.
- Papalamprou, E., Doxastakis, G., Biliaderis, C., Kiosseoglou, V. (2009). Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 337-343.
- Paulsson, M., Dejmek, P., Van Vliet, T. (1990). Rheological Properties of Heat-Induced β -Lactoglobulin Gels. *Journal of Dairy Science*, 73(1), 45-53.
- Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J., Oria, R., Calvo, M. (1992). Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1123(2), 151-155.
- Perrechil, F. A., Braga, A. L. M., Cunha, R. L. (2013). Acid gelation of native and heat-denatured soy proteins and locust bean gum. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(3), 620-627.
- Plietz, P., Damaschun G., Muller, J. J., Schwenke, K. D. (1983). The Structure of 11-S Globulins from Sunflower and Rape Seed. *European Journal of Biochemistry*, 130(2), 315-320.
- Pouzot, M., Nicolai, T., Durand, D., Benyahia, L. (2004). Structure Factor and Elasticity of a Heat-Set Globular Protein Gel. *Macromolecules*, 37(2), 614-620.
- Privalov, P., Khechinashvili, N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *Journal of Molecular Biology*, 86(3), 665-684.
- Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1248(1), 43-49.
- Rafe, A., Vahedi, E., Hasan-Sarei, A. G. (2016). Rheology and microstructure of binary mixed gel of rice bran protein–whey: effect of heating rate and whey addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a.
- Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., Ferreira, S. T. (2003). Functional Properties of Purified Vicilins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and Cowpea Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5792-5797.

- Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22(1), 59-66.
- Renard, D. (1994). Etude de l'aggrégation et de la gélification des protéines globulaires: application à la β -lactoglobuline.
- Renard, D., Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins: effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(5), 287-291.
- Renkema, J. M. S. (2004). Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 39-47.
- Riddick, T. M. (1968). Control of colloid stability through zeta potential. *Blood*, 10(1).
- Roesch, R., Juneja, M., Monagle, C., Corredig, M. (2004). Aggregation of soy/milk mixes during acidification. *Food Research International*, 37(3), 209-215.
- Roesch, R. R., Corredig, M. (2005). Heat-induced soy-whey proteins interactions: formation of soluble and insoluble protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3476-3482.
- Roesch, R. R., Corredig, M. (2006). Study of the effect of soy proteins on the acid-induced gelation of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8236-8243.
- Ryan, K., Vardhanabhuti, B., Jaramillo, D., van Zanten, J., Coupland, J., Foegeding, E. (2012). Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 411-420.
- Ryan, K. N., Zhong, Q., Foegeding, E. A. (2013). Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability-a hypothesis paper. *Journal of Food Science*, 78(8), 1105-1115.
- Salgin, S., Salgin, U., Bahadır, S. (2012). Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: the effects of ion types and ionic strengths. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7, 2404-2414.
- Savage, G., Deo, S. (1989). The nutritional value of peas (*Pisum sativum*). A literature review. *the Nutrition Abstracts and Reviews (Series A)*.59(2), 66-88.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., Wu, S.Y. (1998). β -Lactoglobulin: structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8(2), 65-72.

- Sawyer, L., Kontopidis, G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 136-148.
- Schmitt, C., Bovay, C., Rouvet, M., Shojaei, Rami, S., Kolodziejczyk, E. (2007). Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties. *Langmuir*, 23(8), 4155-4166.
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Creamer, L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at pH 2.5 as influenced by ionic strength and protein concentration. *International Dairy Journal*, 10(4), 233-240.
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., Creamer, L. K. (1999). Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal*, 9(11), 791-800.
- Schwenke, K. D., Henning, T., Dudek, S., Dautzenberg, H., Danilenko, A. N., Kozhevnikov, G. O. (2001). Limited tryptic hydrolysis of pea legumin: molecular mass and conformational stability of legumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(2), 175-182.
- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*, 102(4), 1119-1130.
- Shewry, P. R., Casey, R. (1999). Seed proteins. Springer, pp. 1-10 Netherlands.
- Stein, W. H., Moore, S. (1949). Amino acid composition of β -lactoglobulin and bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 178, 79-91.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food research international*, 76, part1, 31-38.
- Subirade, M., Gueguen, J., Schwenke, K. D. (1992). Effect of dissociation and conformational changes on the surface behavior of pea legumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 152(2), 442-454.
- Sun, X. D., Arntfield, S. D. (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food research international*, 43(2), 509-515.
- Sun, X. D., Arntfield, S. D. (2011). Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 577-582.

- Sun, X. D., Arntfield, S. D. (2012). Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 325-332.
- Tandang-Silvas, M. R. G., Fukuda, T., Fukuda, C., Prak, K., Cabanos, C., Kimura, A., et al. (2010). Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1432-1442.
- Tang, C. H., Wang, X. Y., Yang, X.Q., Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 432-437.
- Tarrega, A., Ramírez-Sucre, M., Vélez-Ruiz, J., Costell, E. (2012). Effect of whey and pea protein blends on the rheological and sensory properties of protein-based systems flavoured with cocoa. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 467-474.
- Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. *Food Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, pp., 171-198.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(6), 589-601.
- Townend, R., Weinberger, L., Timasheff, S. N. (1960). Molecular interactions in β -lactoglobulin. IV. The dissociation of β -lactoglobulin below pH 3.52. *Journal of the American Chemical Society*, 82(12), 3175-3179.
- Tzitzikas, E. N., Vincken, J.P., de Groot, J., Gruppen, H., Visser, R. G. (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 425-433.
- Unterhaslberger, G., Schmitt, C., Sanchez, C., Appolonia-Nouzille, C., Raemy, A. (2006). Heat denaturation and aggregation of β -lactoglobulin enriched WPI in the presence of arginine HCl, NaCl and guanidinium HCl at pH 4.0 and 7.0. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 1006-1019.
- van Vliet, T., Lakemond, C. M. M., Visschers, R. W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 298-304.
- Venir, E., Marchesini, G., Biasutti, M., Innocente, N. (2010). Dynamic high pressure-induced gelation in milk protein model systems. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 483-494.

- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., de Kruif, K. G. (1998). Kinetics of Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 896-903.
- Vischers, R. W., de Jongh, H. H. J. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23(1), 75-80.
- Voutsinas, L. P., Cheung, E., Nakai, S. (1983). Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatured Proteins. *Journal of Food Science*, 48(1), 26-32.
- Wagner, J. R., Sorgentini, D. A., Añón, M. C. (2000). Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3159-3165.
- Wong, D., Vasanthan, T., Ozimek, L. (2013). Synergistic enhancement in the co-gelation of salt-soluble pea proteins and whey proteins. *Food Chemistry*, 141(4), 3913-3919.
- Zheng, B.-A., Matsumura, Y., Mori, T. (1993). Conformational changes and surface properties of legumin from broad beans in relation to its thermal aggregation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(8), 1366-1368.
- Zhu, H., Damodaran, S. (1994). Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 846-855.
- Zúñiga, R. N., Tolkach, A., Kulozik, U., Aguilera, J. M. (2010). Kinetics of Formation and Physicochemical Characterization of Thermally-Induced β -Lactoglobulin Aggregates. *Journal of Food Science*, 75(5), 261-268.

Annexe

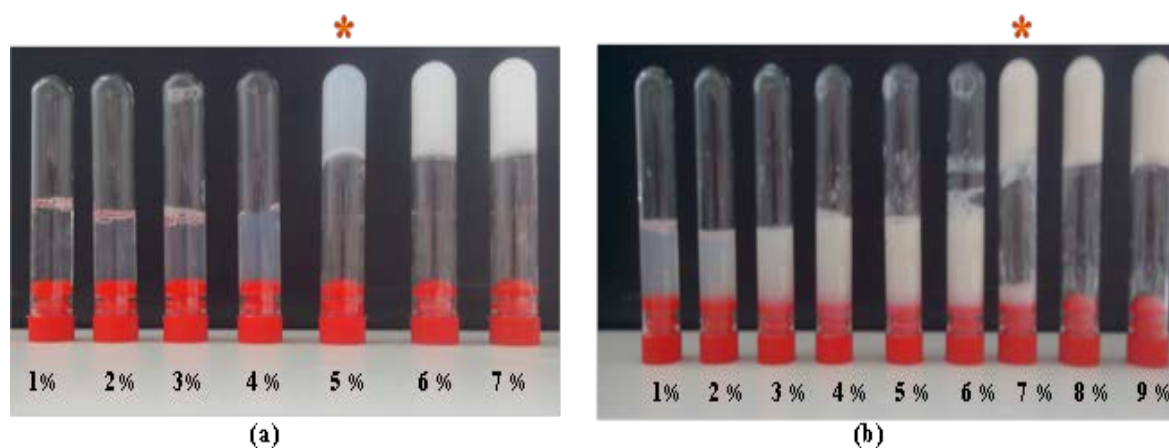


Figure.1. Concentration minimale de gélification thermique (C_{gth}) **(a)** β -lactoglobuline, **(b)** Globuline de pois ; chauffage à 85 °C pendant 60 mn à 5 mM NaCl, pH 7,2.

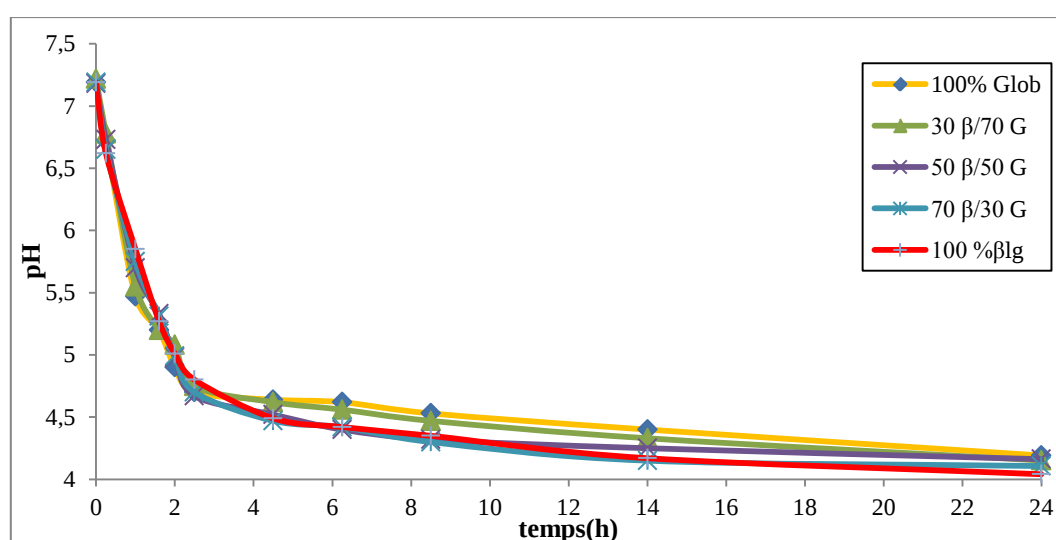


Figure.2. Cinétique d'acidification des agrégats de β lg et de Glob 4,5 % (m/v) et les mélanges mixtes chauffé simultanément a différent ratios β lg/Glob respectivement de 30/70 ; 50/50 ; 70/30. L'acidification est réalisée par l'ajout de GDL (0.75%), suivi en fonction du temps d'incubation (24heure) à une température de 25°C.

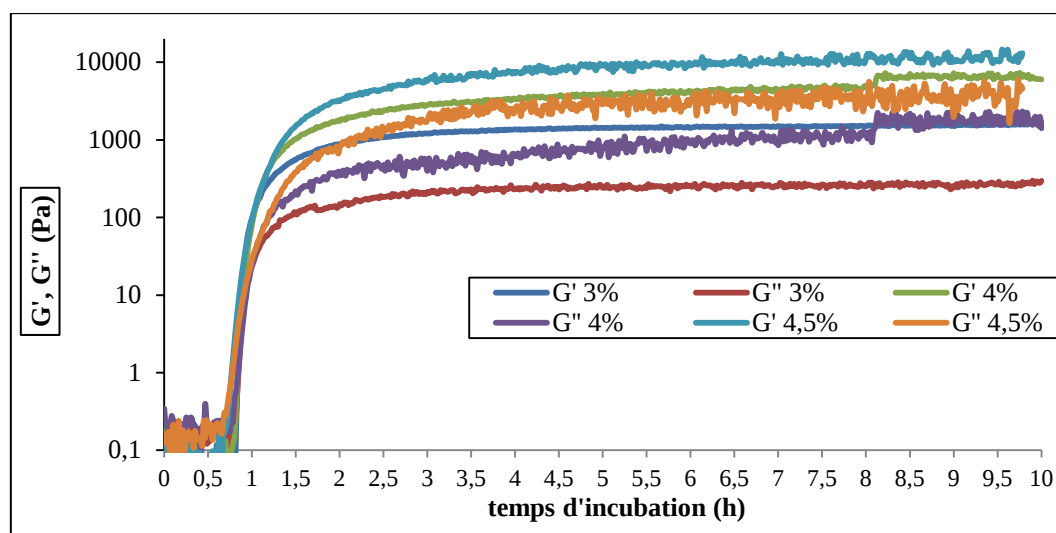


Figure.3. Evolution du module de conservation G' en fonction de temps d'incubation (10 heure) agrégats de β lg à différents concentrations protéiques respectivement de 3, 4, 4,5 % ; incubés en présence de GDL, à 25 °C.

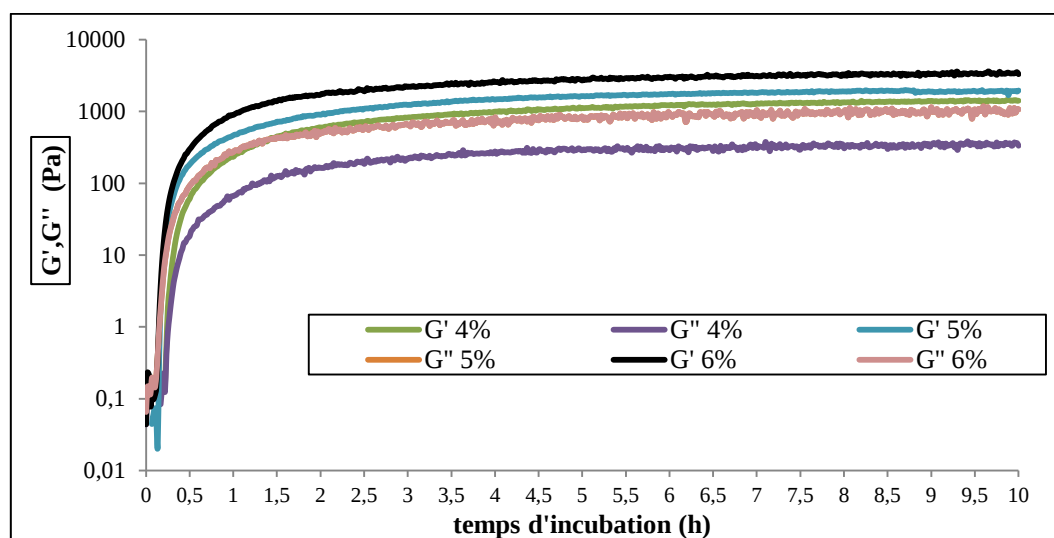


Figure.4. Evolution du module de conservation G' en fonction de temps d'incubation (10 heures) agrégats de Glob à différents concentrations protéiques respectivement de 3%, 4%, 5%, 6% ; incubés en présence de GDL, à 25 °C.

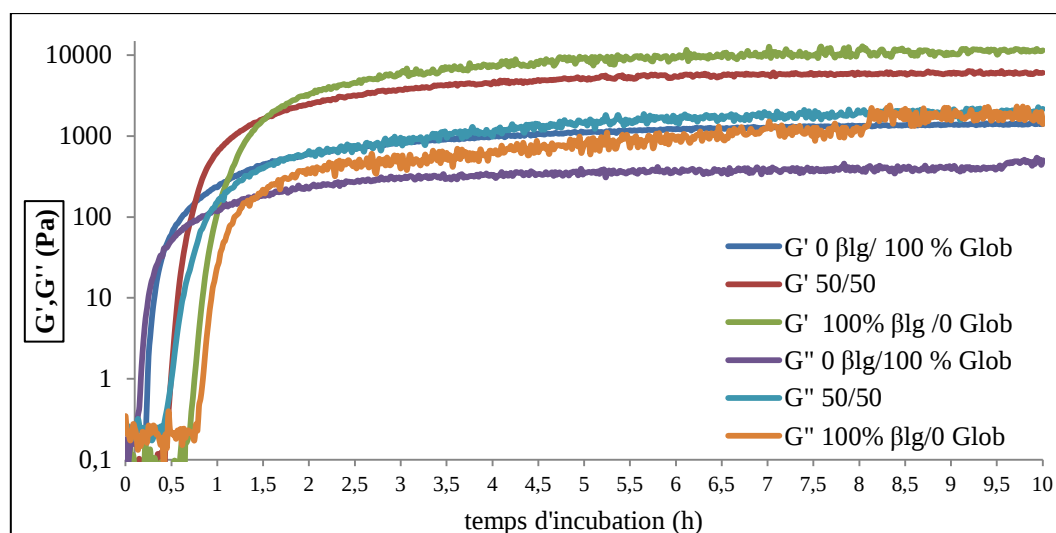


Figure.5. Evolution du module de conservation G' , G'' et le croisement entre G' et G'' en fonction du temps à 25 °C, pour des agrégats βlg de Glob, et le mélanges βlg/Glob de ratios 50/50, à une concentration protéique de 4,5 %, incubé en présence de GDL, pendant 10 heures.

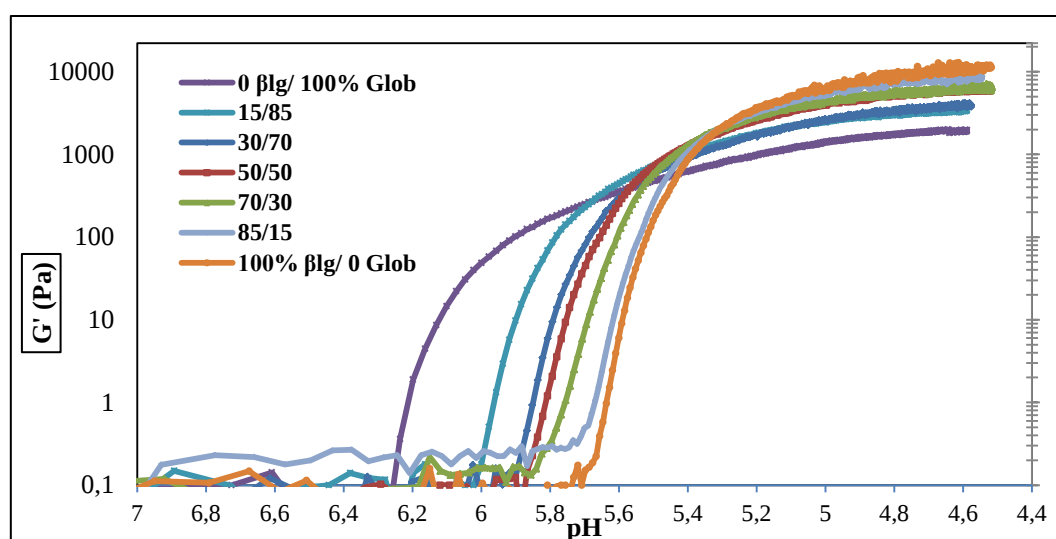


Figure.6. Evolution du module de conservation G' en fonction du pH à 25 °C, pour des agrégats βlg de Glob, et des mélanges de différents ratios βlg/Glob, à une concentration protéique de 4,5 %, incubé en présence de GDL, pendant 10 heures.

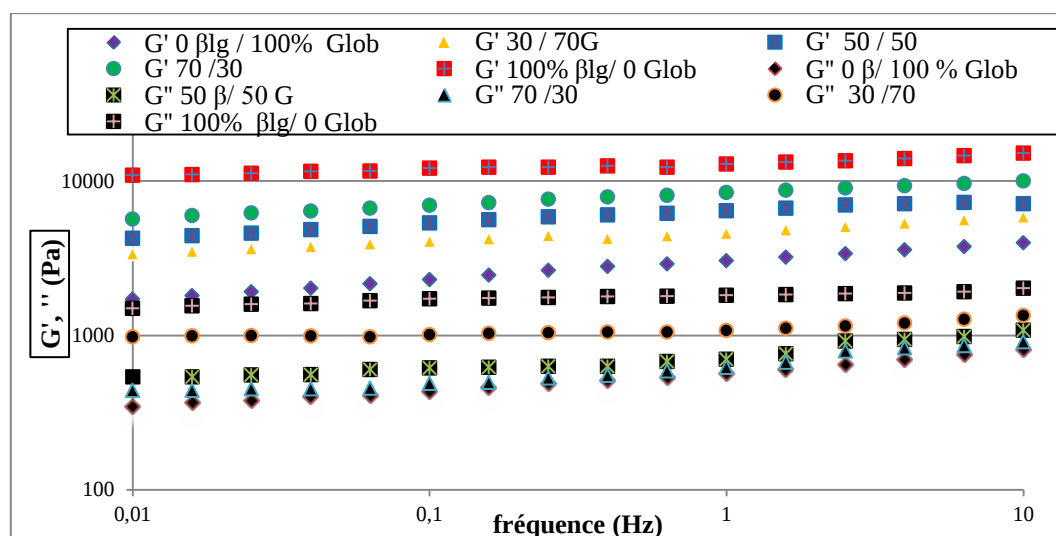


Figure.7. Spectre mécanique (G' , G'' en fonction de la fréquence) des gels mixtes de différents ratios β lg/Glob chauffé simultanément à une concentration protéique de 4,5 %, en fin de gélification (après 10heures) à 25 °C.

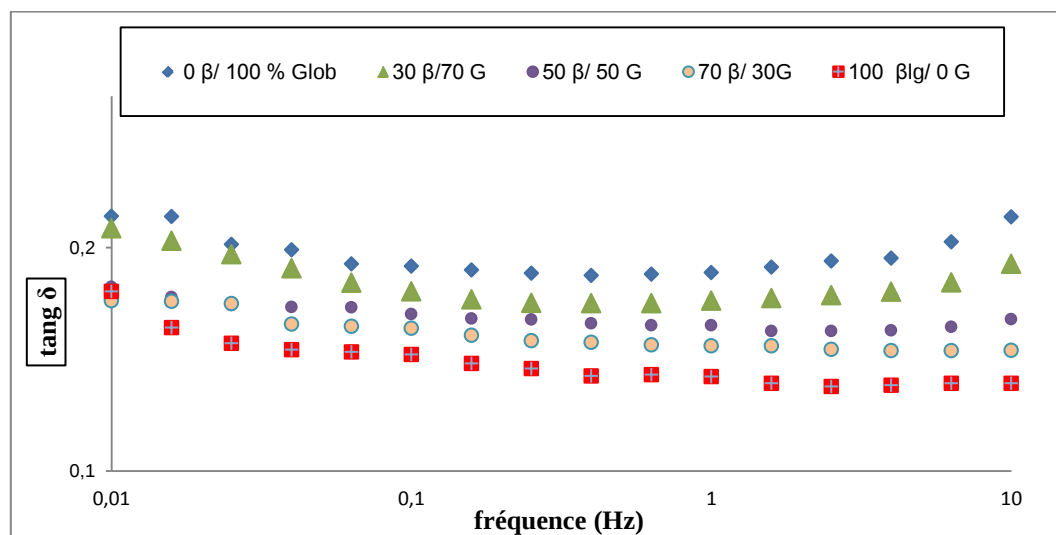


Figure.8. Spectre mécanique ($\tan \delta$ en fonction de la fréquence) des gels mixte acides de β lg/Glob par voie 1 à une concentration de 4,5 % en fin de cinétique de gélification, en fin de gélification (après 10heures) à 25 °C.

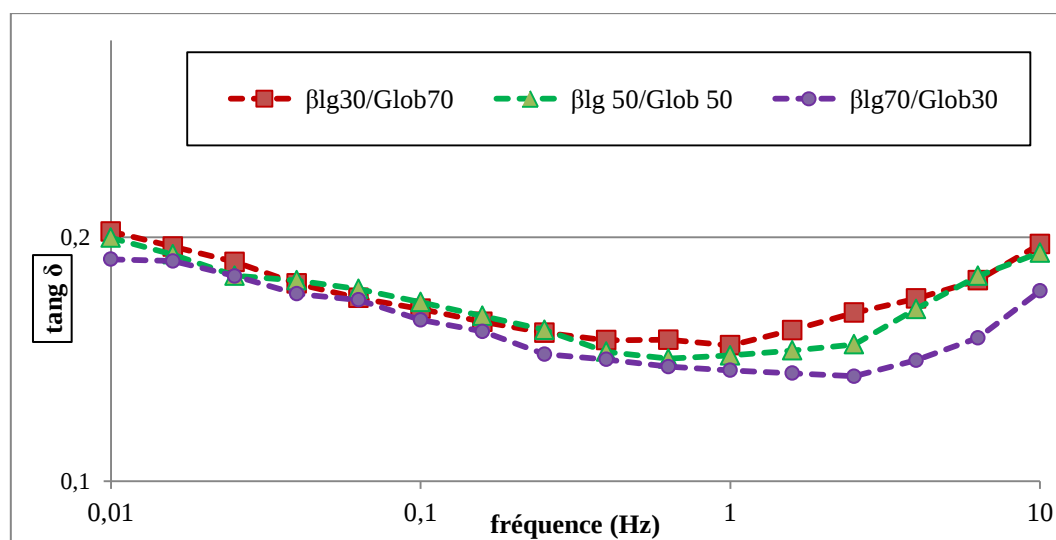


Figure.9. Spectre mécanique (tang δ en fonction de la fréquence) des gels mixte acides de β lg / Glob (préparés à base des agrégats chauffé séparément, à une concentration protéique de 4.5 % et en fin de cinétique de gélification à 25 °C).

Liste des publications

Mession J-L, **Chihi ML**, Sok N, Saurel R. Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids* 2015;46:233-243.

Chihi M-L., Mession J-L., Sok N., Saurel R. Heat-induced soluble protein aggregates from mixed pea globulins and β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem. J.*, **2016**, 64 (13), pp 2780–2791 .

Chihi M-L., Sok N., Saurel R. Synergistic enhancement in the acid cold-set gelation of aggregates soluble pea globulin and β -lactoglobulin. En préparation.

Liste de participation

Chihi M-L., Sok N., Mession J-L., Saurel R. caractérisation des agrégats soluble mixte de globuline de pois et de β -lactoglobuline. 20^{ième} **Forum des Jeunes Chercheurs** Juin 24-25, 2014, Besancon, France. Affichage par Poster.

Chihi M-L., Sok N., Mession J-L., Saurel R. The effect of β -lactoglobuline on improving the pea globulin aggregation. **7th International Whey Conference**. September, 07-09 2014, Rotterdam, Netherlands. Affichage par Poster

Chihi M-L., Sok N., Mession J-L., Saurel R. Cold set gelation of β -lactoglobuline on improving the pea globulin aggregation. 21^{ième} **Forum de jeunes chercheurs** Juin 17-19, 2015, Dijon, France. Affichage par Poster