



université  
PARIS-SACLAY

# Protéines Sous Stress

**Camille LOUPIAC**

Maître de Conférences, AgroSup Dijon  
Equipe de recherche PCAV (Physico-Chimie des Aliments et du Vin)  
UMR PAM A 02.102 (Procédés Alimentaires et Microbiologiques)  
Université de Bourgogne Franche-Comté- AgroSup Dijon

*Manuscrit destiné à l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des  
Recherches de l'Université Paris-Sud*

# Sommaire

Préambule	p3
I. Curriculum Vitae	p7
1- Etat Civil, diplômes et expériences professionnelles	p7
2- Responsabilités collectives et administratives	p8
3- Responsabilités de Projets de Recherche académiques ou industriels	p8
4- Encadrement de stagiaires et de doctorants	p9
5- Publications et communications	p10
II. Activités de Recherche	p14
1- Positionnement des activités de Recherche	p14
1.1 Positionnement au sein de l'équipe PCAV	p14
1.2 Positionnement au sein du Laboratoire Léon Brillouin	p15
1.3 Positionnement national et international	p16
2- Bilan des activités de Recherche	p16
2.1 Protéines sous stress : apport de la diffusion de neutrons	p16
2.1.1 Dénaturation aux interfaces	p17
2.1.2 Effet des hautes pressions	p24
2.1.3 Séchage et réhydratation	p28
2.2 Imagerie neutronique appliquée à la Science des Aliments	p33
2.2.1 Réhydratation des poudres de lait	p34
2.2.2 Stockage de produits céréaliers extrudés	p36
2.2.3 Bouchons de liège de différentes qualités	p38
2.2.4 Cuisson de la viande	p42
3- Projet de Recherche	p45
3.1 Interactions entre les matériaux organiques et inorganiques	p47
3.2 Nouvelles sources de protéines	p48
III. Activités d'Enseignement	p49
1- La formation d'ingénieurs	p50
2- Les formations « autres »	p51
3- Projet d'Enseignement	p52
2.1 Master Recherche	p52
2.2 Internationalisation des formations	p52
IV. Conclusion	p54
Bibliographie	

# Préambule

***Je tiens à commencer ce préambule, en remerciant mes parents, Danielle et Jean Loupiac, pour leur présence et leur soutien depuis ma thèse jusqu'à cette HDR. D'autre part, j'ai eu la chance de pouvoir m'appuyer pour la rédaction de ce manuscrit sur les conseils et la relecture du Dr. José Teixeira, Directeur de recherche émérite au Laboratoire Léon Brillouin. C'est un grand honneur que d'avoir pu bénéficier de ses précieux conseils et je le remercie pour le temps qu'il a passé à m'accompagner dans ce travail. Ces trois personnalités sont pour moi des modèles à suivre pour leur carrière professionnelle, leur engagement pour le collectif, et leur passion du partage de la connaissance.***

Ce mémoire est destiné à l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches et retrace une partie des activités de recherche et d'enseignement que j'ai menées depuis mon recrutement à l'ENSBANA en 2003, d'abord comme Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) puis comme Maître de Conférences en Biochimie des Aliments en 2004. J'ai choisi de l'intituler « PROTEINES SOUS STRESS » car mes activités, aussi bien de recherche que d'enseignement, sont centrées sur l'étude de ces macromolécules biologiques que sont les « PROTEINES ». Je les ai découvertes, d'un point de vue expérimental, dans mon cursus universitaire, en 1995, lors d'un stage sur les enzymes immobilisées que j'ai effectué dans le laboratoire de biotechnologie que dirigeait le Professeur Claude Burstein à Jussieu. Ce stage s'est déroulé sous la responsabilité (et la bienveillance) d'Ahmed Haouz (aujourd'hui en charge de la plateforme cristallographie de l'Institut Pasteur). Ces deux grands chercheurs sont à l'origine de ma passion pour la science expérimentale (vive la paillasse !), de mon entrée en recherche, et je tiens à les en remercier. C'est aussi dans ce laboratoire que j'ai appris à travailler sur la science à finalité appliquée, puisqu'il s'agissait d'optimiser la fabrication de biocapteurs à base d'enzymes permettant de doser des éléments polluants de l'eau ou de valider des étapes du traitement des eaux usées. Pour autant, Claude Burstein, étant l'un des élèves de Jacques Monod, tenait à ce que nous maîtrisions parfaitement les concepts théoriques de l'enzymologie, et nous répétait que seuls les travaux sur des systèmes modèles, nous permettraient d'optimiser les applications des enzymes : déjà la recherche fondamentale au service des applications et de l'innovation ! Pour le DEA et la poursuite des études, en tenant compte de mon profil transversal entre la biologie (DEUG de Sciences de la vie) et la chimie-physique (Licence et Maîtrise de Chimie Physique), il m'a orientée vers l'équipe du Professeur Bernard Alpert, qui travaillait sur la physico-chimie des hémoprotéines au laboratoire de Biologie Physico-Chimique de Jussieu. C'est auprès de Bernard Alpert, et surtout du Dr. Serge Pin, mon co-directeur de thèse, que j'ai appris la biochimie des protéines, la rigueur de la préparation des échantillons et la nécessité de l'approche multi-outils-multi-échelles, pour décrire structure et dynamique des protéines en relation avec leur fonction. Dans cette équipe, nous maîtrisions tous la purification et la biochimie des hémoprotéines. A tour de rôle, nous allions au centre de transfusion sanguine chercher des culots de sang pour purifier l'hémoglobine humaine; parfois les plages des côtes bretonnes nous permettaient de nous approvisionner en aphysie pour purifier sa myoglobine si particulière. Mais, ayant comme modèle d'étude l'hémoglobine de la carpe et sa fixation de ligands exacerbée avec le pH, j'ai été la chanceuse qui a eu le luxe, pendant sa thèse, de traverser le quartier Monge pour aller de la poissonnerie Monge au laboratoire, en longeant le Jardin des Plantes et descendant la rue Cuvier avec une poubelle d'eau chargée de carpes vivantes. En arrivant au laboratoire, il fallait faire vite et le collectif se mettait à la purification du stock d'hémoglobine des carpes!...Quel bon souvenir d'équipe! Merci à tous les anciens de chez Bernard, et surtout, merci Serge, mon mentor dans le domaine de la purification des protéines! Une fois cette production de masse de « beaux » échantillons réalisée, nous avons besoin de différents outils d'analyse, que nous n'avions pas au laboratoire. Pour accéder à ces outils, nous avons le carnet d'adresses de Bernard Alpert (physicien de formation) et allions utiliser ces outils chez ses amis physiciens. Parfois, il était gênant de ne pas disposer de l'outil nécessaire, mais au final ces collaborations ont été déterminantes dans mon apprentissage de la biophysique car, il a fallu discuter et expliquer les objectifs des expériences à nos hôtes; aussi il fallait comprendre le

vocabulaire et les outils développés par des chercheurs d'autres communautés, le plus souvent des physiciens. Je suis fière d'appartenir à cette école, celle des élèves de Bernard Alpert et de Serge Pin, dont les grandes valeurs sont l'importance de la maîtrise des échantillons, l'observation multi-échelles et la collaboration avec des chercheurs d'autres domaines. J'essaie de transmettre aux jeunes chercheurs qui travaillent avec moi cette façon de faire de la recherche, collaborative et transversale.

C'est au cours de la thèse que j'ai eu mon premier accès à la diffusion neutronique et à la dénaturation des protéines grâce à Patrick Calmettes. En biochimie, physicochimie, biologie structurale ou biophysique (disciplines qui sont à la base de ma formation universitaire et au cœur de mes travaux de recherche) et encore plus en sciences de l'aliment, il est nécessaire de connaître l'impact de procédés sur la fonction ou la fonctionnalité des protéines, ce qui explique l'autre partie du titre de ce mémoire « SOUS STRESS ». Les stress évoqués sont la température, les hautes pressions, la présence de matériaux inorganiques, les sels, les solvants, souvent appelés conditions ou agents dénaturants dans le jargon des biochimistes ou des physico-chimistes. Après ma thèse, j'ai continué à travailler sur les protéines, objets des études de mes deux post-doctorats. Dans la continuité de la thèse, pendant mon premier stage post-doctoral au Laboratoire Léon Brillouin (LLB), j'ai travaillé sur la dénaturation sous pression de la myoglobine, avec les Dr. Patrick Calmettes et Marco Bonetti. Cette collaboration m'a montré l'importance de l'instrumentation, tant la conception, due à Marco, de la cellule Hautes Pressions pour des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles a été déterminante. C'est aussi pendant ce premier stage post-doctoral, que j'ai travaillé auprès du Dr. Marie-Claire Bellissent-Funel et de Jean-Marc Zanotti sur l'étude des changements de dynamique de l'hémoglobine humaine selon son état de ligandation par diffusion quasi-élastique de neutrons. La gamme de temps couverte par l'instrument utilisé ne nous a pas permis de conclure sur un éventuel changement de dynamique de la protéine lors de la fixation de ligands. Néanmoins, au travers de cette partie du post doctorat au LLB, j'ai pu découvrir d'autres instruments de diffusion neutronique, et j'ai beaucoup appris sur les potentialités de ces grands instruments.

Cela a aussi été le début de mon étude des protéines « SOUS STRESS ». Ensuite, je suis partie aux Etats-Unis, à l'Université d'Illinois à Chicago, pour deux ans, pour étudier d'autres protéines, les protéines membranaires des virus, et apprendre un autre outil de caractérisation de la structure des protéines, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces protéines sont de gros édifices membranaires, constituées de plusieurs domaines qui, pour pouvoir être étudiées par RMN, doivent être produites et marquées avec des isotopes ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , D...) par biologie moléculaire (protéines recombinantes). Je me suis donc mise à la biologie moléculaire avant de faire des études de biophysique sur une partie de la protéine gp41 du virus du HIV, protéine responsable de l'entrée du virus dans la cellule infectée. En plus de la découverte de ces nouvelles approches expérimentales, auprès de Michael Caffrey, j'ai appris la gestion de projets de recherche en observant l'action d'un grand directeur d'équipe de recherche. J'ai particulièrement aimé son approche très optimiste et enthousiaste de la recherche et sa façon de susciter l'émulation intellectuelle des jeunes chercheurs et de ses collaborateurs par de brèves discussions quasi quotidiennes sur les actualités scientifiques ainsi que par des moments hebdomadaires de convivialité collective, parfois inoubliables: "the friday beer" !

L'accomplissement de ce parcours, a été le poste que j'ai obtenu à Dijon, à l'ENSBANA (aujourd'hui AgroSup Dijon), dans l'équipe « Ingénierie Moléculaire et Sensorielle des Aliments et des Produits de Santé- IMSAPS », aujourd'hui équipe PAV (Physico-Chimie des Aliments et du Vin), où le Dr. Philippe Cayot (aujourd'hui Professeur) et le Professeur Martine Le Meste m'ont recrutée pour travailler sur les protéines du lait et leur dénaturation. A l'époque, au laboratoire, les stress appliqués aux protéines du lait se limitaient à la température et aux co-solvants. Dans ce cadre, Philippe Cayot m'a encouragée à continuer mon approche avec des systèmes modèles, en utilisant tous les outils de la biophysique. Ma connaissance de la diffusion de neutrons était un plus, et aider mes collègues à utiliser ces outils faisait partie de la mission de recherche qui m'avait été confiée. J'ai donc repris la

démarche de l'école « Alpert-Pin » et me suis attelée à la purification des protéines modèles. J'ai bénéficié des connaissances de Philippe et de l'histoire du laboratoire dans le domaine de la chimie du lait, et j'ai pu purifier la beta-lactoglobuline, qui est ainsi devenue l'une de mes protéines fétiches ! En même temps, en recherche comme en enseignement, j'ai découvert le monde de l'agroalimentaire, ou de la science des aliments. Je me suis plongée dans la complexité des matrices alimentaires, j'ai beaucoup appris sur les procédés alimentaires, j'ai découvert une démarche expérimentale différente de la mienne, parfois plus empirique, ou donnant beaucoup d'importance aux observations macroscopiques. J'ai essayé d'amener une autre approche, plus moléculaire. Au fil du temps, j'ai eu de plus en plus d'interaction avec des industriels, grâce à l'enseignement notamment. J'ai ainsi été de plus en plus sollicitée pour enseigner dans des formations de professionnels de l'agroalimentaire au niveau de notre centre de transfert sur les thématiques relatives aux protéines de lait, aux impacts des procédés (séchage, pression, extrusion..) sur les protéines, et plus récemment sur les nouvelles sources de protéines. J'ai eu la chance de participer à l'encadrement d'une petite partie de plusieurs thèses qui portaient sur les protéines, où mon apport a souvent été d'amener à la compréhension des mécanismes de dénaturation des protéines à l'échelle moléculaire. Un certain nombre de mes collègues et des élèves-ingénieurs m'ont suivie au LLB, dans les centres de neutronique ou dans les synchrotrons, et certains sont maintenant des adeptes de ces instruments.

Après 10 ans de carrière à l'ENSBANA-AgroSup, j'ai eu le désir d'interrompre mon activité pour ré-apprendre de nouvelles choses ! Grâce à Christiane Alba- Simionesco, directrice du LLB, j'ai obtenu une délégation au CNRS pour implanter un instrument d'imagerie (IMAGINE) au LLB, et développer son utilisation en sciences de l'aliment. J'ai travaillé avec plaisir pendant deux ans sur ce projet avec Sylvain Désert, Arnaud Héлары et Frédéric Ott. De nombreux sujets d'étude des laboratoires dijonnais sont passés sous les neutrons d'IMAGINE (dès sa naissance). C'est le cas des bouchons de Thomas Karbowski et Régis Gougeon, des produits céréaliers de Dominique Champion, des vignes de Marielle Adrian et Sophie Trouvelot ! Aujourd'hui la station IMAGINE existe et me permet de continuer de travailler dans cette équipe. A la fin de la délégation, a été signée une convention cadre entre AgroSup Dijon et le LLB qui facilite nos interactions dans le domaine de l'application des neutrons à l'agroalimentaire tant en recherche qu'en enseignement. Je remercie les collègues du LLB, notamment Fabrice Cousin, Florence Porcher et Sophie Combet, et les collègues dijonnais, en tout premier lieu Ali Assifaoui, Philippe Cayot et Dominique Champion, qui m'ont beaucoup aidée dans ce cheminement.

Concernant les protéines, un stress d'un autre ordre s'est profilé et nécessite que les biochimistes mettent à nouveau « la main à la pâte » pour concevoir des protocoles innovants d'extraction et de purification à partir des matières premières agricoles. En effet, il s'avère que, compte tenu de l'augmentation de la population mondiale, et des évolutions d'habitudes de consommation, nous arrivons à la fin de notre capacité à produire suffisamment de protéines conventionnelles (lait, viande, soja, pois..) pour nourrir l'ensemble de la population mondiale. Il existe un STRESS sur l'approvisionnement mondial en protéines. Il faut donc se tourner vers de nouvelles sources de protéines pour l'alimentation humaine, issues des insectes et des algues par exemple, que les biochimistes doivent apprendre à connaître. C'est une partie de mon projet de recherche.

Ce manuscrit est divisé en trois parties. Dans une première partie, je présente mon *curriculum vitae* qui synthétise mon parcours professionnel, mes responsabilités et ma production scientifique. Dans la deuxième partie, qui porte sur mon activité de recherche, j'explique la démarche mise en œuvre pour étudier les protéines sous stress depuis ma nomination à Dijon et j'essaie de montrer l'apport de la diffusion de neutrons en sciences de l'aliment. J'ai choisi d'illustrer cette partie avec des exemples de travaux auxquels j'ai participé ou que j'ai menés. Je termine cette deuxième partie en parlant de mes projets de recherche qui portent sur les interactions protéines-matériaux inorganiques et les nouvelles sources de protéines. Enfin, dans la dernière partie, je reviens sur mon activité d'enseignement. J'ai donc gardé le meilleur pour la fin, tant cette activité m'est chère et correspond au métier que je voulais faire : enseignante ! Etant une fervente adepte et défenderesse de la « formation par la recherche »,

j'essaie de montrer les interactions que j'ai pu établir entre mon enseignement et ma recherche. Ceci m'amène au projet d'enseignement développé dans ce mémoire, qui porte sur ma responsabilité récente d'un master recherche et de l'obtention d'un financement d'excellence pour internationaliser cette formation : projet ISITE de création d'un master Recherche mundus.

# I- Curriculum Vitae

## 1- Etat Civil, diplômes et expériences professionnelles

### ✓ Etat Civil

Camille Loupiac  
Née le 5 Avril 1971 à Tournan en Brie  
Nationalité française

Adresse personnelle : 6 rue François Dameron, 21000 Dijon

Adresse professionnelle : bureau 101, bâtiment Epicure, AgroSup Dijon  
Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon  
Téléphone : 03 80 77 40 84

mail: [camille.loupiac@agrosupdijon.fr](mailto:camille.loupiac@agrosupdijon.fr)

### ✓ Diplômes

DEUG Sciences de la Vie, Université Paris VII, Jussieu (1993)

Licence et Maîtrise de Chimie Physique, Université Paris VII, Jussieu, Paris (1995)

DEA de Chimie Bioinorganique, Université Paris XI, Orsay (1996)

Doctorat de Chimie Bioinorganique de l'Université Paris XI, Orsay (1999)

Thèse réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Physicochimique, Université Paris VII, Paris  
*"Etudes spectroscopiques de la structure et de la dynamique des hémoprotéines"*  
Directeur de thèse: Pr. Bernard Alpert; Co-directeur: Dr. Serge Pin

### ✓ Expériences professionnelles

Chargée d'exposés au palais de la découverte en section chimie, Paris (1996-1998)  
*Présentation de la chimie de l'Aspirine au grand public*

Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER), Université Paris VII, Paris (1998-1999)

*96h d'enseignement (TD et TP) « structure et interactions des macromolécules biologiques, Licence de Biochimie*

Chercheur Post-doctoral, Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS), Saclay (2000-2001)

*Effets des hautes pressions sur la structure de la Myoglobine (diffusion de neutrons aux petits angles) / Utilisation de la diffusion inélastique de neutrons pour étudier la dynamique de l'hémoglobine humaine*

Chercheur Post-doctoral, Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Illinois à Chicago, Chicago, Etats Unis (2001-2003)

*Marquage isotopique de la protéine transmembranaire gp41 du HIV pour détermination de sa structure par RMN haute résolution*  
*Expression de protéines recombinantes par biologie moléculaire*

Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER), Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation (ENSBANA), Dijon (2003-2004)

*192h d'enseignement (CM, TD TP), Ingénieurs 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année d'études, module chimie de l'aliment et des procédés, module physicochimie, projets pré-industriels, stages*

Maître de Conférences AgroSup Dijon (MESR, Section CNU 64) (2004- )

*Disciplines enseignées (Chimie analytique, Biochimie, Spectroscopies), Ingénieurs, Licence, Masters*  
*Chercheur de l'équipe PCAV, au sein de l'UMR PAM, A 02. 102. Université de Bourgogne Franche-Comté-AgroSup Dijon*

Depuis septembre 2012 : collaboratrice extérieure au Laboratoire Léon Brillouin, UMR12, CEA-CNRS, Saclay

## **2- Responsabilités collectives et administratives**

2006-2010: Agent Chargé de la Mise en Œuvre de l'hygiène et de la sécurité (ACMO), Université de Bourgogne, pour l'équipe EMMA et l'enseignement de chimie

2006-2010: Co-responsable du Master 1 « Qualité des Aliments et Sensorialité », mention Sciences des aliments Master co-habilité par l'Université de Bourgogne et AgroSup Dijon

2006-2015: Représentante des biologistes au sein du comité de pilotage du réseau national des technologies des hautes pressions (CNRS, MRCT)

2010: *co-organisatrice du forum des technologies des hautes pressions, Biarritz*

2012: *co-directrice de rédaction et d'édition de l'ouvrage: "Hautes Pressions: les nouveaux enjeux", MRCT-CNRS.*

2010-2012: Coordinatrice des formations LMD et autres, Direction des Formations et de la Vie Etudiante (DFVE), AgroSup Dijon

2011-2017: Membre élue, dans le collège des utilisateurs, du conseil d'administration de la société française de neutronique (SFN)

2015 (5 au 8 octobre) : *co-organisatrice des 23èmes Journées de la Diffusion Neutronique, à Evian (<http://www.sfn.asso.fr/jdn/site-jdn-23/>).*

2016- : Responsable du Master international « MP<sup>2</sup> : Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes », option physicochemistry, Mention Sciences et Technologies de l'Alimentation de l'Agriculture et de l'Environnement, Université de Bourgogne Franche -Comté, Master co-habilité par l'Université de Bourgogne et AgroSup Dijon.

*(Obtention d'un financement I-Site, internationalisation des formations : 75 000 euros/ an de 2018-2020)*

## **3- Responsabilités de Projets de Recherche académiques ou industriels**

2011-2012: Contrat de prestation de recherche et de développement. Financier: Ingredia SA, montant: 12 000 euros

*"Recherche de moyens de détection de dénaturation protéique"*

2012-2014: Responsable scientifique du projet d'imagerie et de la nouvelle station d'imagerie du Laboratoire Léon Brillouin- Encadrement des expériences des « friendly users »- collaboration à la rédaction des propositions d'expériences en Avril 2014 et Octobre 2014

2013-2014 : Contrat de prestation de recherche et de développement. Financier : Nestec, PTC Konolfingen : 9 500 euros

*"Interaction between milk protein and polysaccharides"*

2013-2017: OSEO, Contrat cadre, Aide au Projet Structurant des Pôles de Compétitivité, programme «OPEN FOOD SYSTEM», projet "OPTICOOK". Budget: 668 000 euros dont un financement de thèse.

*"Compréhension des modes et paramètres de cuisson et de leur influence sur les aliments. Identification des marqueurs physiques et chimiques repérables par des capteurs et significatifs des étapes clé de la cuisson"*

2013 : Co-organisatrice de la chaire itinérante «Diffusion de neutrons et matière molle» Dijon, 27 et 28 novembre (co-financement d'AgroSup Dijon : 1 600 euros)

2014 : Co-organisatrice de la conférence internationale « Neutrons & Food 3 »

Paris, du 9 au 11 juillet 2014 (co-financement d'AgroSup Dijon : 1 600 euros)

(<http://neutronsandfood.com/>)



2014-2015: Responsable du projet de recherche « Neutron and magnetic resonance imaging to observe water in food », axe EMERGENCE, Labex PALM (Physique: Atomes Lumière Matière), Université Paris-Saclay, budget : 36 000 euros

2016-2018 : Contrat de prestation de recherche et de développement. Financeur : Nestec, NRC Konolfingen : 12 172 euros

*"Extraction and functionalities of oat proteins"*

#### **4- Encadrement de stagiaires et de doctorants**

L2 (BTS) et M1 : de 2004 à 2017: 1 à 2 par an

Master 2 :

1- Sonia Lequin: Master Recherche Science des Aliments et Science du Comportement, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 2006-2007, «Etude des Interactions protéines–pectines pour la mise au point d'émulsions séchées encapsulant une substance liposoluble». (Taux d'encadrement 50%).

2- Gaëlle Simonin : Stage de Recherche de deuxième année Ingénieur AgroAlimentaire, AgroSup Dijon, en collaboration avec le Max Planck Institut for Polymer, Material Science Group, Mayence Allemagne, Mai à Octobre 2006, « Characterization of Beta-lactoglobulin and model membrane interactions by surface plasmon spectroscopy ». (Taux d'encadrement 25%).

3- Matteo Gumiero: Master Erasmus, Université de Udine, Italie, Tesi, 2006-2007, « Hydration effects on structure and dynamics of beta-lactoglobulin ». (Taux d'encadrement 50%).

4- Chloé Champagne : Stage de Recherche de deuxième année Ingénieur AgroAlimentaire, AgroSup Dijon en collaboration avec le Max Planck Institut for Polymer, Material Science Group, Mayence Allemagne, Mai à Octobre 2008, « pH influences on the interfacial behaviour of beta-lactoglobulin ». (Taux d'encadrement 25%).

5- Simone Scussat: Master Erasmus, Université de Udine, Italie, Tesi, 2009-2010, « Structural impact of pre-heating treatments on whey proteins: biophysical studies from macroscopic to molecular scale ». (Taux d'encadrement 80%).

6- Cyrielle Maissiat : Master Recherche Science des Aliments et Science du Comportement, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 2009-2010, «Etude des Interactions entre différentes protéines et des solides poreux lors du collage du vin». (Taux d'encadrement 50%).

7- Valentin Alcantara : Stage de Recherche de deuxième année Ingénieur AgroAlimentaire, AgroSup Dijon en collaboration avec l'Institut Paul Scherrer, groupe Neutron Imaging, Villingen, Suisse, Mai à Octobre 2008, « Impact of water on the structure and the behavior of cork sealants ». (Taux d'encadrement 25%).

8- Aline Maire Du Poset : Master Recherche Science des Aliments et Science du Comportement, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 2014-2015, « Etudes structurales d'un mélange de bêta-lactoglobuline et d'acide polygalacturonique en solution : Impact des ions calcium ». (Taux d'encadrement 50 %).

9- Marta Lant : Master Erasmus, Université de Udine, Italie, Tesi, 2014-2015, « Master Erasmus, Université de Udine, Italie, Master Tesi, 2014-2015, « Impact of temperature on meat proteins : study of myosin and hemoglobin mixture by fluorescence ». (Taux d'encadrement 100%)

10- Justine Chonigbaum: Stage de Recherche de deuxième année Ingénieur AgroAlimentaire, AgroSup Dijon en collaboration avec l'Université de Flinders, février à Août 2016, « Etude structurale de l'adsorption de la beta-lactoglobuline sur une surface inorganique en présence de resveratrol ». (Taux d'encadrement 40%).

11- Shobiga Saravanapavan : Master Contrôle et Analyse Chimiques, UBFC, Dijon, Avril à Septembre 2017, « Impact des procédés d'extraction sur la structure des protéines d'insectes » - Présentation d'un poster au workshop, Inectinov 2, Romainville 10-12 octobre 2017, « Structural studies on soluble

insect proteins extracted from *Tenebrio Molitor* larvae », Camille Loupiac, Shobiga Saravanapavan, Nadège Silvera, and Samir Mezdour. (Taux d'encadrement 80%).

12- Alessandro Placa : Master Erasmus, Université de Teramo, Italie, Thèse, Mars à Août 2017, « Mild fractionation of microalgae main components : impact of the parameters of high pressure extraction ». (Taux d'encadrement 50%).

13- Pierre Fouilloux : Master Recherche Microbiology and PhysicoChemistry for food and wine Processes, 2017-2018, Titre du projet de recherche : Impact de la pré-dénaturation de la beta-lactoglobuline sur son interaction avec l'acide polygalacturonique, en cours. (Taux d'encadrement 50%).

Thèses :

1-Ann Falk (Junghans), 2006-2009, Université de Mayence, Allemagne, Collaboration avec l'Institut Max Planck des Polymères, Directeur de thèse : Pr. W. Knoll (encadrement 10%), Co-encadrants : Dr. Ingo Koeper (65%), et Dr. Camille Loupiac (25%)

Sujet de thèse: "Structural characterization of tBLMs: from anchor modifications to biomimetic platform."

*Ann Junghans est aujourd'hui chercheuse aux Etats-Unis. Elle a un poste permanent au centre national de neutrons de Los Alamos. Elle est en charge d'un réflectomètre de neutrons et des applications en matière molle.*

2-Simone Scussat, 2013-2016, Université de Bourgogne, directeur de thèse : Pr. P. Cayot (encadrement 20%), Co-encadrant : Dr. Camille Loupiac (80%)

Sujet de thèse: "Identification des marqueurs repérables par des capteurs spectroscopiques et significatifs des étapes clés de la cuisson de viande et de poisson. "

*Simone Scussat est aujourd'hui en CDI comme ingénieur R&D dans la société IMPROVE à Amiens, société spécialisée dans la valorisation des protéines végétales.*

## **5- Publications et communications**

✓ Publications dans des revues avec comité de lecture (20, h index : 8, IF moyen : 2,12)

1- Protein relaxation without a geminate phase in nanosecond photodissociated CO carp hemoglobin, LOUPIAC C., KRUK N., VALAT P., ALPERT B. Chemical Physics Letters (1999), 302, 627-632. (IF, 1,860)

2- <sup>13</sup>C NMR spectrum field and temperature dependence of <sup>13</sup>CO bound to hemoglobin, DEBOUZY J.C., LOUPIAC C., PERRIN A., PIN S., DABOUIS V., FAVIER A., THOMASSON F., ALPERT B. Annales Pharmaceutiques Françaises (2000), 58, 1-6. (IF, 0,15)

3- <sup>13</sup>CO exchange process between the hemoglobin irons observed with <sup>13</sup>C NMR, LOUPIAC C., PIN S., VEZIN H., ALPERT B. Chemical Physics Letters (2001), 344, 457-462. (IF, 1,860)

4- High-pressure effects on horse heart metmyoglobin studied by small-angle neutron scattering, LOUPIAC C., BONETTI M., PIN S., CALMETTES P. European Journal of Biochemistry (2002), 269, 1-7. (IF, 2,65)

5- Beta-lactoglobulin under high pressure studied by small-angle neutron scattering, LOUPIAC C., BONETTI M., PIN S., CALMETTES P. Biochimia and Biophysica Acta, generals subjects, (2006), 1764, 211-216. (IF, 4,702)

6- Effect of iron chelates on oil-water interface, stabilized by milk proteins: the role of phosphate groups and pH. Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties, GUZUN-COJOCARU T., CAYOT P., LOUPIAC C., CASES E. Food Hydrocolloids, (2010), 24, 364-373. (IF, 2,659)

7- Structure of calcium and zinc pectinate films investigated by FTIR spectroscopy, ASSIFAOU A., LOUPIAC C., CHAMBIN O., CAYOT P. Carbohydrate Research, (2010), 345, 929-933. (IF, 1,898)

8- Protein-Lipid Interactions at the Air-Water Interface, JUNGHANS A., CHAMPAGNE C., CAYOT P., LOUPIAC C., KOPER I. *Langmuir*, (2010), 23(14), 12049-12053. (IF, 4,268)

9- Structural relaxation during drying and rehydration of food materials. The Water Effect and the Origin of Hysteresis, CHAMPION D, LOUPIAC C, SIMATOS D, LILLFORD P, CAYOT P. *Food Biophysics*, (2011), 6, 160-169. (IF, 1,704)

10- Probing Protein-Membrane Interactions Using Solid Supported Membranes, JUNGHANS A., CHAMPAGNE C., CAYOT P., LOUPIAC C., KOPER I. *Langmuir* (2011), 27 (6), 2709–2716. (IF, 4, 186)

11- Dynamic and sub-ambient thermal transition relationships in water–sucrose solutions. Differential scanning calorimetry and neutron scattering analysis, CHAMPION D., LOUPIAC C., RUSSO D., SIMATOS D., ZANOTTI J-M. *Journal of Thermal Analysis* (2011), 104 (1), 365-374. (IF, 2,09)

12- Myoglobin on silica: a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics, DEVINEAU S., ZANOTTI J.-M., LOUPIAC C., ZARGARIAN L., NEIERS F., PIN S., RENAULT J.P. *Langmuir* (2013), 29 (44), 13465–13472. (IF, 4,384)

13- The impact of high hydrostatic pressure on structure and dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin, RUSSO D., ORTORE M.G., SPINOZZI F., MARIANI P., LOUPIAC C., ANNIGHOFER B., PACIARONI A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* (2013), 1830, 4974-4980. (IF, 3,829)

14- The cork viewed from the inside, LAGORCE-TACHON A., KARBOWIAK T., LOUPIAC C., GAUDRY A., OTT F., ALBA-SIMIONESCO C., GOUGEON R. D., ALCANTARA V., MANNES D., KAESTNER A., LEHMANN E., BELLAT J-P., *Journal of Food Engineering* (2014), 149, 214-221. (IF, 3,099)

15- Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit, ASSIFAOU, A., LERBRET, A., HUYNH, UTH., NEIERS, F., CHAMBIN, O., LOUPIAC, C., COUSIN, F., *Soft Matter* (2014), 11(3),551-560. (IF, 3,889)

16- Structural studies of adsorbed protein (Betalactoglobulin) on natural clay (Montmorillonite), ASSIFAOU A., HUAULT L., MAISSIAT C., ROULLIER-GALL C., JEANDET P., HIRSCHINGER J., RAYA J., LAMBERT J-F., JABER M., CAYOT P., GOUGEON R., LOUPIAC C. *RSC Advances* (2014), 4, 61096- 61103. (IF, 3,108)

17- Neutron imaging of meat during cooking, SCUSSAT S., OTT F., HELARY A., DESERT S., CAYOT P., LOUPIAC C. *Food Biophysics* (2016), 11(3), 207-212. (IF, 1,704)

18- How neutron scattering experiments can target the structure and dynamics of milk proteins?, LOUPIAC, C. *Current Opinion In Food Science*, (2016), 9, 93-97. (SNIP, 0,883)

19- The impact of cooking on meat microstructure studied by low field NMR and Neutron Tomography, SCUSSAT S., VAULOT C., OTT F., CAYOT P., DELMOTTE L., LOUPIAC C. *Food Structure* (2017),14, 36-45. (SNIP, 1,105)

20- Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin, MODUGNO C., LOUPIAC C., BERNARD A., JOSSIER A., NEIERS F., PERRIER-CORNET J-M., SIMONIN H. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (2018),47, 9-15. (IF, 2,573)

✓ Publications dans des actes de congrès avec comité de lecture

1- IMAGINE: a cold neutron imaging station at the Laboratoire Léon Brillouin, OTT F., LOUPIAC C., DESERT S., HELARY A., LAVIE P. *Physics Procedia* (2015), 69, 67-70

2- Neutron scattering and imaging: a tool for archaeological studies, TEIXEIRA J., MAGLI R., LOUPIAC C. *Eur. J. Mineral.* (2015), 27, 289–296.

✓ Publications dans des revues à accès libre

1- Impact of preparation process on the protein structure and on the volatile compounds in Eisenia foetida protein powders, BOU-MAROUN E., LOUPIAC C., LOISON A., ROLLIN B., CAYOT P., CAYOT N., MARQUEZ E, MEDINA AL. Food and Nutrition Sciences (2013) 4(11), 1175-1183.

✓ Publications autres (revues professionnelles, vulgarisation...)

1- How neutron scattering experiments can target the behavior of milk proteins, LOUPIAC C. Neutron News (2012) 23 (2), 22-24.

2-Structuration et stabilité des protéines dans les aliments: rôle clé de l'eau, CHAMPION D., LOUPIAC C. Industries Alimentaires et Agricoles (2012) Nov.-Déc., 4-6.

3- Nouvelles approches d'étude de la dynamique de l'eau dans les matrices alimentaires faiblement hydratées, CHAMPION D., LERBRET A., LOUPIAC C., KARBOWIAK T., ROUDAUT G. Industries Alimentaires et Agricoles (2012) Nov.-Déc., 20-23.

✓ Ouvrages et chapitres d'ouvrages

1- Mesures de diffusion de neutrons aux petits angles pour étudier l'effet des hautes pressions sur la structure des protéines globulaires LOUPIAC C., BONETTI M., PIN S., CALMETTES P. dans Outils et méthodes pour la recherche à haute pression, CNRS Editions, (2005) 82-86.

2- Water in dairy product, SIMATOS D, CHAMPION D, LORIENT D, LOUPIAC C, ROUDAUT G. In: advanced Dairy Chemistry-3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents, 3rd. Eds.: McSweeney PLH, Fox PF. EDN. Springer, New York, (2009) 457-526.

3- La biologie sous pression: de la molécule au procédé, FOURME R., HAMEL G., LOUPIAC C., PERRIER-CORNET J-M., PIN S., ROCHE S. dans "Hautes pressions: les nouveaux enjeux", MRCT-CNRS Editions, (2012) 31-56.

4- Hautes Pressions: les nouveaux enjeux, LE GODEC Y., LOUPIAC C., PRAT A., Edition MRCT-CNRS, (2012) ISBN: 978 2- 918 701-10-1.

✓ Conférences orales sélectionnées

1- Loupiac C (2006), Beta-lactoglobulin under high pressure studied by small-angle neutron scattering, Colloque CNRS "Discussions on Protein Hydration and Structural Dynamics High Pressure and other approaches, 27-30 Août, St Martin de Londres, France

2- Loupiac C (2007), Hydration effects on beta-lactoglobulin dynamics and stability ESF-FWF Conference. Water Interfaces in Physics, Chemistry and Biology: A Multi-Disciplinary Approach. Universitätszentrum Obergurgl (Ötz Valley, near Innsbruck), 8-13 Décembre 2007, Autriche

3- Loupiac C (2008), Globular proteins and high pressure studied by small angle neutron scattering, International Conference on High Pressure and Molecular Biophysics, 10-12 décembre 2008, Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin, France

4- Loupiac C (2011), Applications AgroAlimentaires : Comment les expériences de diffusion de neutrons peuvent rendre compte du comportement de protéines modèles dans l'aliment ?, JDN19, Batz sur mer, 6-10 juin 2011, France

5- Loupiac C (2012), Major role of water on protein structure and dynamics. Impact of processes on food proteins, Neutron and Food 2, TU Delft, 29 janvier-1er février 2012, Pays-Bas

6- Loupiac C (2016), Food proteins under processes studied by neutron scattering and imaging, JDN24, Carqueiranne, 4-6 mai 2016, France

7- Loupiac C (2016), L'impact des hautes pressions sur les ingrédients des aliments étudié par diffusion de neutrons, 10ème Forum technologie des hautes pressions, 10-13 octobre 2014, La Londe Les Maures, France

✓ Conférences orales invitées

1- Loupiac C (2005), Structure and dynamics of milk proteins studied by neutron scattering: an overview, COST 921 Structural organization and impact on flavour release and perception, 20-21 octobre 2005, Copenhague, Danemark

2- Loupiac C (2009), Food ingredients under high pressure: an overview  
47ème EHPRG Conference. Pre-school, 4 au 6 septembre 2009, Paris, France

3- Loupiac C (2010), Protein structure (SANS), water and protein dynamics (Elastic and Inelastic Neutron Scattering), and protein–lipids interface (Neutron Reflectivity). How neutron scattering experiments can target the behaviour of model food proteins?, Neutron and Food, 30 octobre au 3 novembre 2010, Sydney, Australie

4- Loupiac C (2014) EFPRG, Food ingredients under high pressure  
52ème EHPRG conference, Pre-school, 5 au 7 septembre 2014, Lyon, France

5- Loupiac C (2014), Neutron imaging and Meat cooking, New X-ray Imaging Methods for Food Applications (NEXIM), 25 et 26 septembre 2014, Copenhague, Danemark

6- Loupiac C (2015), Food proteins under processes studied by neutron scattering and imaging, Journées Scientifiques Matière Molle pour la Science des Aliments, 28 et 29 octobre 2015, Montpellier, SupAgro, France

7- Loupiac C (2016), Neutron Instruments are relevant tools to study proteins in food matrices, IUFOST 18th world congress of food science and technology, 21 au 25 Août 2016, Dublin, Ireland

8- Loupiac C (2016), Neutron Imaging and Soft Matter, French –Swedish Winter School in Neutron Scattering, 6- 9 décembre 2016, Uppsala, Suède

9- Loupiac C (2017), Food proteins under processes studied by neutron scattering and imaging, SuMo Biomaterials conference, 31st of August to 1st of September 2017, Goteborg, Chalmers University, Suède

✓ Vulgarisation scientifique

1- Festival de la cristallographie: 17 et 18 janvier 2014, Les Cordeliers, Paris : animation d'un atelier sur le chocolat

2- Concours National de Croissance Cristalline des lycéens, 26 mai 2014, remise des prix aux lauréats à l'école des mines de Paris : conférence de vulgarisation : « Nous sommes entourés de cristaux, les cristaux sont partout : les cristaux dans les aliments »

3- Journée CristalO, 6 juillet 2014, Musée des Arts et Métiers, Paris : animation d'un atelier sur le chocolat et conférence de vulgarisation : « des bonbons au chocolat : des cristaux à déguster »

4- Fête de la Science, 14 et 15 Octobre 2017, Dijon : Animation du stand d'AgroSup Dijon avec les étudiants du Master MP<sup>2</sup> : « Les cristaux dans les aliments »

## II- Activités de Recherche

L'ensemble des chercheurs de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologie (PAM) s'intéresse aux micro-organismes, aux aliments et au vin. Nous cherchons à comprendre les phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui déterminent la qualité des aliments afin de développer de nouveaux aliments ou de nouveaux procédés alimentaires. L'UMR est constituée de trois équipes complémentaires :

- ✓ l'équipe « Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques » (PMB),
- ✓ l'équipe « Vin-Aliment-Microbiologie-Stress » (VALMIS),
- ✓ l'équipe « Physico-Chimie des Aliments et du Vin » (PCAV).

La recherche au sein de l'UMR PAM est articulée autour de 4 axes transversaux qui portent sur :

- ✓ le stress microbien,
- ✓ la structure des matériaux biologiques en relation avec l'eau,
- ✓ l'encapsulation et l'activité des substances encapsulées,
- ✓ l'oxydation des aliments et du vin.

L'équipe PCAV travaille sur les applications de la chimie et de la physico-chimie aux aliments, aux vins et à certains produits de santé, en regardant en particulier les effets des procédés industriels sur la structure et la dynamique moléculaire dans les matrices. Cette thématique scientifique renvoie à la formulation en lien avec un procédé visant la maîtrise des qualités sensorielles des aliments et des vins, la conservation des aptitudes fonctionnelles des protéines, le contrôle de la rétention, de la diffusion et de la libération de petites molécules d'intérêt sensoriel, nutritionnel, d'hygiène ou de santé.

Au sein de l'équipe PCAV, j'étudie les corrélations entre la structure des protéines, la mobilité moléculaire et leurs propriétés fonctionnelles (gels, émulsions, hydratation...) dans différentes matrices alimentaires (lait, viande,...). Je m'intéresse en particulier à :

- ✓ la beta-lactoglobuline, l'hémoglobine ou la myoglobine, pour l'étude de protéines globulaires avec des structures organisées ;
- ✓ à la myosine pour l'étude de protéines fibrillaires ;
- ✓ à la caséine pour l'étude de protéines avec une structure désorganisée.

Comme il s'agit de protéines modèles, leur biochimie est bien connue, ce qui permet de les purifier en grande quantité sous forme native. J'étudie ces protéines en fonction de paramètres environnementaux tels que le pH, la force ionique, la présence de co-solvants, la température et la pression, en utilisant de nombreux outils de la biophysique (spectroscopies UV-Visible, infrarouge, fluorescence, diffusion de la lumière, calorimétrie,...) pour décrire leur structure et leur dynamique sous stress. D'autre part, l'ensemble des techniques de diffusion de neutrons (petits angles, réflectivité, temps de vol..) permet la caractérisation de ces protéines ayant un intérêt agroalimentaire et une meilleure compréhension des effets des conditions physicochimiques sur ces structures.

Explicitement, les études portent sur :

- ✓ la dynamique de l'eau dans des produits peu hydratés (poudres de lait par exemple),
- ✓ la structure et la dynamique des protéines en milieu confiné (interactions de protéines avec des argiles ou des matériaux poreux),
- ✓ les effets de procédés, tels que les hautes pressions et la cuisson, sur la structure des protéines de viande ou du lait,
- ✓ la structure des macromolécules aux interfaces ou dans des films (interactions protéines-polyosides-minéraux ou interface protéine-lipide ou air).

Depuis septembre 2012, je suis collaboratrice extérieure au Laboratoire Léon Brillouin, et associée au nouvel instrument d'imagerie neutronique IMAGINE, chargée du développement et de son utilisation dans le domaine de la science des aliments.

### 1. Positionnement des activités de recherche

#### 1.1. Positionnement au sein de l'équipe PCAV

Depuis mon doctorat, il me semble évident que seule la synthèse des approches structurale, dynamique et énergétique des protéines peut rendre compte de leur fonction. Les macromolécules biologiques, grâce à leurs fluctuations de structure, locales ou de domaines ainsi qu'aux transferts d'énergie au sein même de la matrice protéique ou avec le milieu extérieur (interactions avec le solvant), sont des systèmes hors d'équilibre capables de réguler ou moduler en permanence leur fonction biologique. L'ensemble de mes travaux de recherche me permet d'envisager les applications possibles d'un certain nombre de techniques biophysiques (spectroscopies RMN, Raman, FTIR, CD, calorimétrie, diffusion des neutrons, absorption des RX, photolyse laser) à l'étude de la structure et de la dynamique des protéines dans des matrices modèles ou dans des matrices complexes comme les aliments.

Ainsi, dès mon arrivée au sein de l'équipe PCAV en 2003, j'ai poursuivi l'étude des relations structure-dynamique-fonction de ces macromolécules en m'intéressant plus particulièrement à l'impact des procédés sur ces dernières. Je me suis rapidement intégrée auprès des deux groupes thématiques du laboratoire:

- ✓ les chimistes-biochimistes qui travaillaient sur les aptitudes fonctionnelles des protéines du lait: aptitudes gélifiantes et émulsifiantes (aujourd'hui, groupe "structure des aliments"),
- ✓ les physico-chimistes qui étudiaient les produits peu hydratés et la mobilité de l'eau autour de la transition vitreuse (aujourd'hui, groupe « transfert de matière dans les aliments et les emballages »).

Les recherches de l'équipe PCAV sont aujourd'hui centrées sur trois grands axes : les transferts de masse dans les aliments ou dans les emballages, la structure des aliments et l'oxydation des aliments et du vin. Récemment, un nouvel axe de recherche s'est créé au sein de l'équipe, portant sur les interactions organique-inorganique. Y participent les collègues qui étudient la physicochimie du vin et ceux plus concernés par les applications pharmaceutiques. Je me suis aussi intégrée dans ce nouvel axe de recherche de l'équipe et je travaille aujourd'hui sur la dénaturation et la structuration des protéines en présence de nanostructures inorganiques (ce qui correspond à l'un de mes projets de recherche).

Mon apport au niveau des axes de recherche de l'équipe PCAV découle de ma connaissance de la biophysique et de la biochimie des protéines. J'essaie d'apporter, au niveau de ces trois thématiques, une meilleure connaissance et la description à l'échelle moléculaire des effets des procédés sur la structure et la dynamique de protéines modèles, en utilisant différents outils spectroscopiques. La diffusion de neutrons a été un outil de choix et complémentaire à d'autres spectroscopies qui nous ont permis de mieux comprendre certains mécanismes de dénaturation protéique. Je dialogue en permanence avec deux communautés assez éloignées l'une de l'autre, d'un côté les physiciens qui nous fournissent les outils d'analyse dont nous avons besoin, et de l'autre les chercheurs en science de l'aliment et du vin qui sont plus proches des applications. Cela me permet, non seulement de développer des connaissances, à travers des travaux très fondamentaux, par exemple sur la dynamique des protéines en lien avec l'eau, la structure des protéines aux interfaces mais aussi de transférer certaines de ces connaissances aux industriels afin qu'ils puissent les décliner dans des applications.

#### *1.2. Positionnement au sein du laboratoire Léon Brillouin\**

*\*2012-2014 : en délégation au LLB*

*\*2014-2017 : collaboratrice extérieure au LLB*

Mon projet de délégation CNRS au LLB avait pour objectif principal de pérenniser la collaboration mise en place depuis plusieurs années entre nos deux équipes, et surtout de compléter les mesures faites sur les différents spectromètres de diffusion neutronique pour mieux comprendre les mécanismes de structuration et de déstructuration des macromolécules et molécules actives des aliments et du vin au cours des procédés. Il s'agissait donc d'utiliser l'ensemble des outils de la neutronique (réflectivité, petits angles, dynamiques élastiques et inélastiques) pour montrer l'apport de ces techniques en complément à d'autres outils biophysiques utilisés au sein de notre équipe dijonnaise. Les études ont porté sur la dynamique de l'eau dans des produits peu hydratés, la structure et la dynamique des protéines en milieu confiné, les effets de procédés comme les hautes

pressions et le séchage sur la structure des matériaux, la structure des macromolécules aux interfaces ou dans des films. L'un des objectifs était d'amener une partie de la communauté de chercheurs du domaine de la science des aliments vers la diffusion de neutrons, en réalisant un travail systématique sur des systèmes modèles mais aussi en ouvrant nos mesures à des matrices complexes maîtrisées (reconstitution d'une matrice complexe). Nous avons développé le potentiel de l'imagerie neutronique sur des matrices complexes mais aussi choisies parce qu'il était possible de corréliser les informations obtenues par imagerie neutronique (sur une échelle de structure de plusieurs micromètres) à des informations obtenues avec les outils plus classiques de la neutronique ou avec les outils d'analyse des aliments ou des matériaux alimentaires (rhéologie, calorimétrie, diffusion de la lumière, microscopie....) qui donnent des informations à l'échelle moléculaire. Aujourd'hui, je suis toujours associée à ce nouvel instrument du Laboratoire Léon Brillouin (IMAGINE) et responsable des applications agroalimentaires. D'autre part, à la fin de ma délégation au Laboratoire Léon Brillouin, une convention cadre entre AgroSup Dijon et le LLB a été signée ce qui facilite aujourd'hui mon accès aux instruments du LLB et les collaborations entre les deux laboratoires sur plusieurs aspects :

- ✓ l'utilisation des instruments dans la formation d'ingénieurs et de master,
- ✓ l'accès aux instruments pour les thésards et chercheurs de PCAV,
- ✓ le développement d'environnements échantillons adaptés à la science des aliments,
- ✓ la participation à des écoles de formation sur la diffusion neutronique,
- ✓ la co-organisation de journées scientifiques autour des neutrons et des aliments.

### *1.3. Positionnement national et international*

De nombreuses équipes nationales et étrangères travaillent sur la dénaturation de protéines modèles ou dans des matrices alimentaires. Grâce à mon positionnement au sein de deux équipes, l'équipe PCAV à Dijon et le LLB à Saclay, ayant un accès privilégié à tous les outils de la diffusion neutronique, l'originalité de mon approche réside dans la prise en compte de la structure et de la dynamique dans les mécanismes de dénaturation des protéines, avec des gammes étendues d'observation de tailles et de temps. De plus, d'une manière générale, les expériences se font sous l'effet du procédé, d'où le titre du mémoire : « protéines sous stress » ! Bien sûr, comme les autres chercheurs, j'utilise aussi les outils plus classiques de la biophysique et de la biochimie des protéines : les spectroscopies (fluorescence, dichroïsme, ...), la chromatographie, l'électrophorèse et la calorimétrie pour visualiser les évolutions de structure des protéines après l'application du stress mais, le plus souvent, nos études se sont faites pendant l'application du stress. Une autre particularité associée à ma collaboration avec le laboratoire Léon Brillouin provient du fait que les mesures de diffusion de neutrons se font très souvent en milieu concentré. Par contre, pour déterminer, à partir de mesures de diffusion de neutrons, les effets des procédés sur des temps ou des distances caractéristiques, il faut travailler sur des systèmes modèles. C'est pour présenter nos résultats sur l'apport de la neutronique à l'étude de la dénaturation des protéines que j'ai été ces dernières années, plusieurs fois invitée à des conférences et workshops en France et à l'étranger, dont la conférence « Neutrons and Food ». D'autres chercheurs français et étrangers dans le domaine de la science des aliments utilisent la diffusion de neutrons pour étudier les protéines. Mon originalité grâce à la richesse des thèmes de recherche développés dans l'équipe PCAV et dans l'UMR PAM (mobilité moléculaire à proximité de la transition vitreuse, structure aux interfaces, dénaturation par séchage et procédés hautes pressions, interaction protéines – polysides, protéines – petites molécules, protéines - argiles...) et de par ma collaboration avec le LLB, réside dans l'approche multi-outils et multi-matrices. Le fait de travailler dans un laboratoire de biochimie alimentaire, me donne l'avantage de pouvoir purifier plusieurs protéines modèles à partir de plusieurs aliments, et de ne pas être centrée sur une seule protéine ou une seule matrice alimentaire. Mes études portent sur les protéines du lait, de la viande et du poisson, des céréales, et plus récemment des microalgues, et des insectes.

## **2. Bilan des activités de Recherche**

### *2.1. Protéines sous stress : apport de la diffusion de neutrons*

La dénaturation des protéines a été très étudiée en biophysique et en biologie structurale et ces travaux trouvent de nombreuses applications aussi bien en médecine, qu'en pharmacie et dans la science des aliments. Dans ces différents domaines, il s'agit de comprendre quel peut être l'impact d'un ou de plusieurs paramètres extérieurs (stress) tels que la température, la pression, le pH et la



force ionique sur les différents niveaux de structure des protéines. En effet, les modifications de structure peuvent avoir des effets importants sur les fonctions biologiques (en science des aliments nous parlerons de fonctionnalité) des protéines. De nombreux travaux ont été menés au sein de l'équipe PAV sur l'aptitude des protéines du lait à former des gels ou à stabiliser des émulsions. Ces études ont concerné des systèmes complexes (poudre de lactosérum, caséinates) [Cayot, 2003; Seuvre, 2004; Houzé, 2005] et des systèmes isolés (beta-lactoglobuline ou beta-caséine) [Cayot 1991; Cases & Cayot, 2005] La beta-lactoglobuline est la protéine du lait qui joue un rôle technofonctionnel essentiel dans un grand nombre d'applications industrielles [Kinsella, 1989]. Ses aptitudes technologiques influent sur la qualité des desserts laitiers, son efficacité en tant qu'additif de gélification en charcuterie, ou encore la stabilisation de vinaigrettes prêtes à l'emploi. Il s'agit d'une protéine globulaire modèle majoritairement constituée de feuilletés beta, dont la structure tridimensionnelle est bien connue [Brownlow, 1997]. La biochimie de cette protéine modèle est parfaitement connue et maîtrisée au laboratoire, ce qui nous a permis d'envisager de nombreuses études biophysiques. De plus, cette protéine peut être purifiée à partir du lait ou à partir de poudres de lactosérum ce qui nous permet d'en obtenir de grandes quantités [Fox, 1967]. Nous avons travaillé sur le protocole de lyophilisation de la protéine, et aujourd'hui nous la conservons sous forme de poudre au congélateur (native et stable). Les différents travaux présentés dans les parties suivantes de ce document montrent comment nous avons utilisé l'ensemble des outils de la diffusion de neutrons pour compléter les approches classiques du laboratoire sur l'étude de cette protéine et apporter une meilleure compréhension de l'impact de procédés (dénaturation aux interfaces, haute pression, séchage) sur la structure de cette protéine modèle. La biochimie d'autres protéines modèles telles que les caséines, les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine et apomyoglobine) et la myosine, est aussi maîtrisée au laboratoire. Cette connaissance de la purification des protéines à partir de la matière première la moins modifiée possible me semble essentielle et primordiale pour produire nos échantillons de protéines natives et envisager de nombreuses mesures de biophysique. Pour autant, cette étape expérimentale qui a occupé et occupe toujours une grande partie de mon activité de recherche est très rarement valorisable en terme de publications. Pour l'anecdote, à mon arrivée au laboratoire dijonnais, je purifiais la beta-lactoglobuline à partir du lait de vache cru, que j'allais chercher tous les mardis et vendredis matin au marché de Dijon. Pour une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles, il me fallait commencer mes étapes de purification au minimum 15 jours avant l'expérience à Saclay. J'ai travaillé sur la purification de cette protéine à partir de différentes poudres de lactosérum, puis sur le protocole de lyophilisation pendant plusieurs années avec des stagiaires de BTS. Aujourd'hui grâce à la mise en place de ce protocole de purification, des grammes de beta-lactoglobuline sont produits au laboratoire par Bernadette Rollin (technicienne du laboratoire) et stockés dans le congélateur, à disposition de tous. Il suffit d'ouvrir le congélateur pour avoir accès à notre or blanc!

### 2.1.1 *Dénaturation interfaciale*

La stabilisation des interfaces par des protéines en milieu biologique, et plus précisément alimentaire, est un sujet d'études important en science des aliments et plus particulièrement au laboratoire. Les interfaces d'intérêt sont de type: liquide/liquide (type émulsion huile/eau), ou air/liquide (type mousse air/eau), stabilisées par des protéines de lait, et notamment par la beta-lactoglobuline (BLG). Les émulsions huile dans eau sont l'un des plus importants composants des aliments. Aussi, l'étude de ces systèmes présente un grand intérêt pour les industries agroalimentaires. La nature amphiphile des protéines en fait de bons agents émulsifiants : elles sont capables de stabiliser les émulsions en s'insérant à l'interface entre une phase aqueuse et une phase lipidique.

Lorsque nous avons commencé cette étude, l'interface protéine-matière grasse et plus particulièrement la structure de la protéine dans le film interfacial était mal caractérisée à l'échelle moléculaire. Il avait été montré, grâce à des travaux de l'équipe [Cases & Cayot, 2005; Cases, 2005; Guzun-Cojocar, 2011], que des traitements de préchauffage de la beta-lactoglobuline augmentaient la rigidité du film interfacial, ou encore que la force ionique ou le pH du milieu dans lequel la protéine est en suspension pouvaient moduler son aptitude émulsifiante. Il nous manquait les outils d'observation de telles interfaces à l'échelle moléculaire pour caractériser la structure de la protéine. J'ai initié une collaboration avec un groupe de recherche de l'institut Max Planck des Polymères à Mayence en Allemagne dont la spécialité résidait sur les études de membranes lipidiques artificielles [Sinner, 2001]; Köper, 2007]. Cette collaboration (au travers notamment de la thèse d'Ann Junghans, aujourd'hui en charge d'un réflectomètre de neutrons dans le centre de neutrons de Los Alamos aux

Etats-Unis) a permis au groupe allemand, spécialisé dans la fabrication et la caractérisation de membranes lipidiques artificielles, de compléter ses acquis par le dépôt de protéines modèles sur ces derniers systèmes. Notre groupe a apporté ses compétences sur la biochimie des protéines et a ouvert un nouveau champ d'application au thème de recherche allemand : une ouverture au monde de l'agroalimentaire où les interfaces (protéines-lipides) sont essentielles à la stabilité des aliments. La figure 1 présente le type d'architecture étudiée: une bicouche de phospholipides sur laquelle ont été déposées des solutions de beta-lactoglobuline.

**Membranes modèles- protéines interpénétrées.**

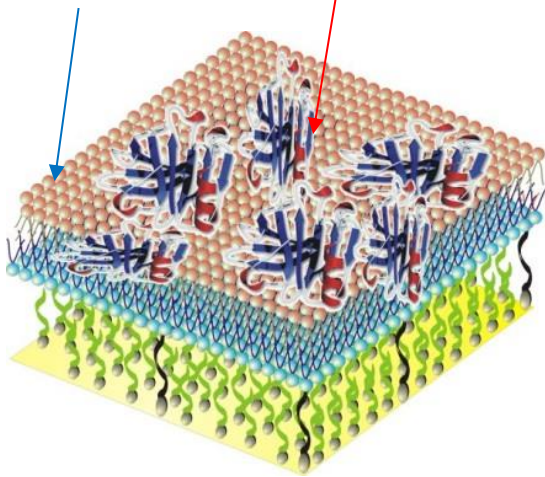


Figure 1 : Schéma de solutions de beta-lactoglobuline déposées sur une membrane (bicouche lipidique) modèle.

Des monocouches de phospholipides ont aussi été développées par l'équipe du Max Planck, en particulier dans la thèse d'Ann Junghans [Junghans, 2010]. Ces membranes modèles sont ancrées sur des supports solides ce qui permet d'utiliser divers outils de caractérisation de la structure des différentes couches de ces assemblages: réflectivité, spectroscopie de surface plasmon, spectroscopie d'impédance. La figure 2 schématise ces assemblages. L'utilisation d'une ancre (attachée de façon covalente au support solide et au lipide étudié) entre la membrane lipidique et le support solide permet à la fois la stabilité des assemblages et de mimer l'intégration d'une protéine dans une membrane biologique.

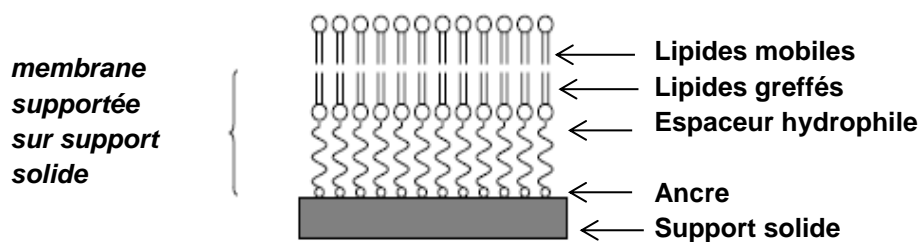


Figure 2: Schéma de l'organisation d'une membrane modèle ancrée sur un support solide.

Au début de la collaboration, l'équipe française a déterminé, grâce à ses compétences en biochimie structurale, les conditions techniques (traitements thermiques et conditions environnementales) permettant d'obtenir des émulsions de différentes stabilités. Puis, suite à la synthèse de membranes lipidiques proches des interfaces huile-eau de l'agroalimentaire, et grâce aux outils de caractérisation de surface que possède le groupe allemand, une corrélation entre stabilité des émulsions et organisation moléculaire du film interfacial a été recherchée. Nous avons montré qu'une pré-dénaturation de la beta-lactoglobuline [Junghans, 2011] augmentait son aptitude à se fixer sur une membrane lipidique (monocouche ou bicouche). Ceci a été vérifié en utilisant la spectroscopie de surface plasmon et la réflectivité de neutrons. La figure 3 résume l'ensemble des architectures lipidiques synthétisées dans la thèse d'Ann Junghans. Les ancres (avec un groupe thiol ou silane)

sont greffées sur un support de silicium (couvert par une fine couche d'or pour les ancrés avec un thiol). Ces ancrés peuvent contenir un ou deux groupes thiols, puis un espaceur plus ou moins long, puis la tête lipidique, groupe diphytanoil dans notre cas (DPTL :  $C_{16}H_{29}O_5S_2$ ). Sur ces monocouches, une autre couche de lipides (cholesterol, triolein, ou Diphytanoilphosphatidylcholine-DyPhyPC) a été déposée pour former une bicouche plus ou moins dense.

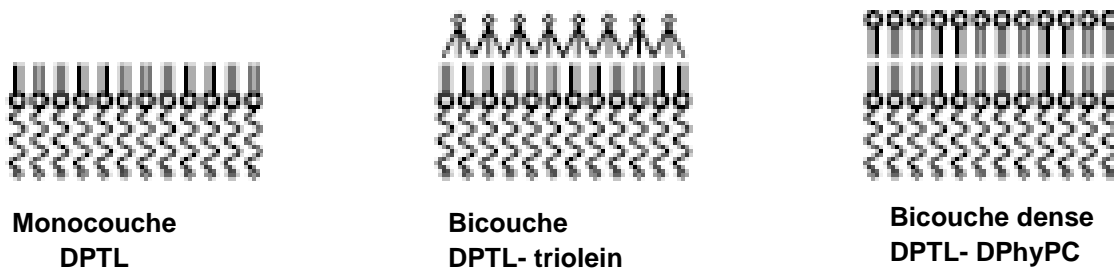


Figure 3 : Membranes modèles synthétisées pour étudier l'interaction BLG/lipides.

Pour observer la structure de ces organisations à l'échelle moléculaire, plusieurs outils ont été utilisés. La spectroscopie de surface plasmon et la réflectivité de neutrons nous ont permis de caractériser les cinétiques d'adsorption et de quantifier les épaisseurs de couches de lipides et de protéines. La balance de Langmuir et la microscopie à l'angle de Brewster ont permis de rendre compte de l'effet de la compaction de la couche de lipides sur l'adsorption de la protéine.

La figure 4 montre les cinétiques d'adsorption de solutions de beta-lactoglobuline obtenues par spectroscopie de surface plasmon sur une monocouche hydrophobe (DPTL), et sur une bicouche dense (DPTL+ DPhyPC).

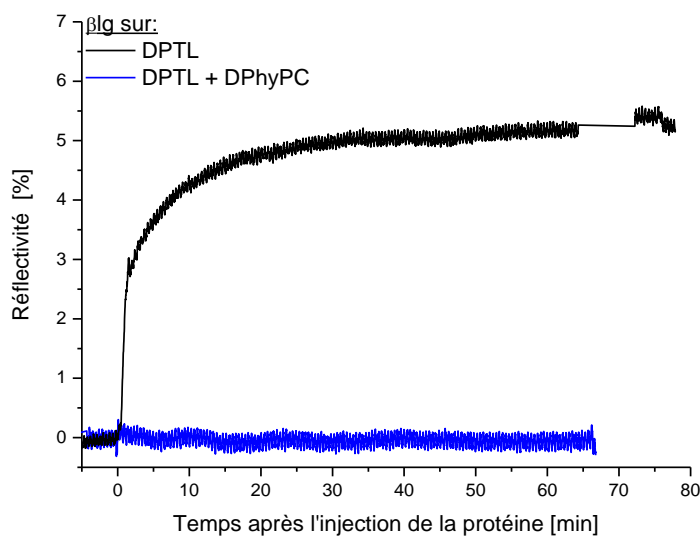


Figure 4 : Comparaison entre les cinétiques d'adsorption de la BLG sur une monocouche (DPTL) ou une bicouche (DPTL-DPhyPC) mesurées par spectroscopie de plasmon de surface.

Sur la bicouche, la protéine ne s'absorbe pas tandis que sur une monocouche de DPTL l'adsorption est terminée au bout de 20 minutes. Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'organisation de ces films protéiques à la surface de mono ou bicouches lipidiques, nous avons utilisé la réflectivité de neutrons. Nous avons cherché à déterminer l'épaisseur des couches de protéines et à savoir si ces dernières étaient interpénétrées ou non dans la couche de lipides. Les spectres de réflectivité de neutrons obtenus après ajout de la BLG sur la monocouche de DPTL montrent de faibles différences d'intensité pour les petites valeurs de Q (figure 5).

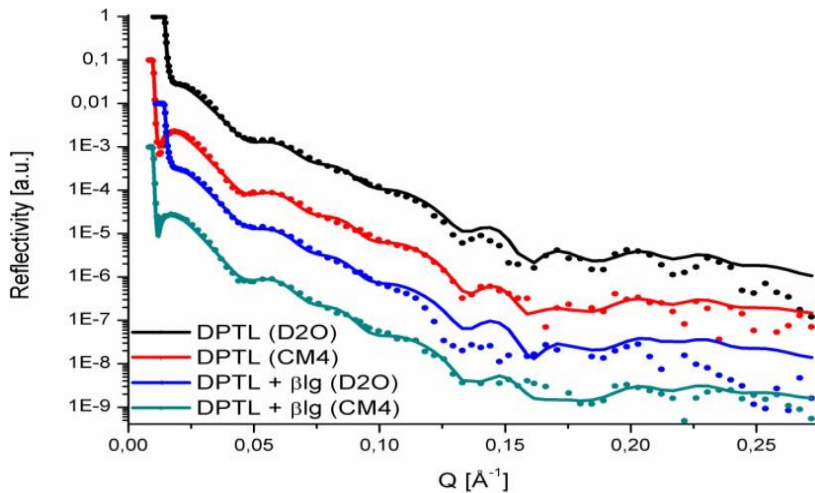


Figure 5 : Spectres de réflectivité de neutrons obtenus pour la monocouche avec et sans protéines. Les courbes en trait continu correspondent aux ajustements des courbes expérimentales (points). Les spectres ont été enregistrés dans deux conditions de contraste. La première, en préparant les échantillons uniquement en présence de D<sub>2</sub>O (DPTL-D<sub>2</sub>O et DPTL+BLG-D<sub>2</sub>O). La deuxième en utilisant un mélange de D<sub>2</sub>O et d'H<sub>2</sub>O, ratio 7 : 3 respectivement, qui donne une densité de longueur de diffusion moyenne de  $4.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ .

La figure 6 présente les profils de densité de longueur de diffusion obtenus pour ces spectres ajustés avec un modèle qui exclut la protéine de la monocouche (spectres et ajustements présentés dans la figure précédente). Une épaisseur de protéines de 2,6 nm est observée. Comparée à la taille caractéristique de la protéine à pH 7 (7,7 nm x 4,4 nm x 4,4 nm pour le dimère, [Brownlow, 1997]), cette épaisseur correspond à une couche de protéines toujours bien structurées.

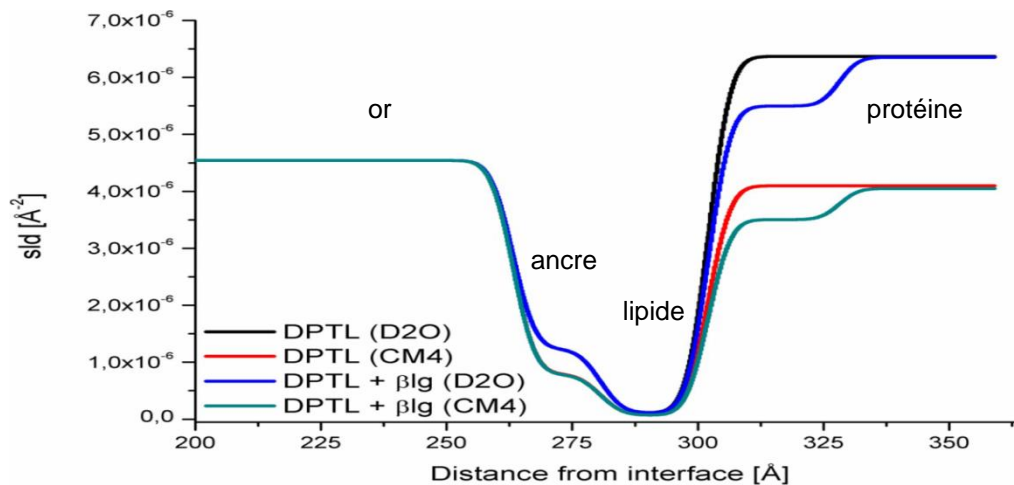


Figure 6 : Profils de longueur de diffusion obtenus suite à l'ajustement des spectres de réflectivité de neutrons pour des monocouches en absence (noire et rouge) ou en présence (bleue et verte) de BLG.

La beta-lactoglobuline a été déposée sur la bicouche lipidique soit sous sa forme native, soit après dénaturation (par l'urée). Le degré de dénaturation de la protéine a été étudié par calorimétrie et spectroscopie de fluorescence. Selon que la protéine soit à l'état natif ou ait été dénaturée, l'adsorption sur une couche de phospholipides n'est pas la même. En effet, comme le montrent les cinétiques d'adsorption enregistrées par spectroscopie de plasmon de surface (figure 7), la protéine native ne s'adsorbe pas sur la bicouche alors que la protéine partiellement dénaturée forme un film d'environ 5 nm à la surface de la bicouche.

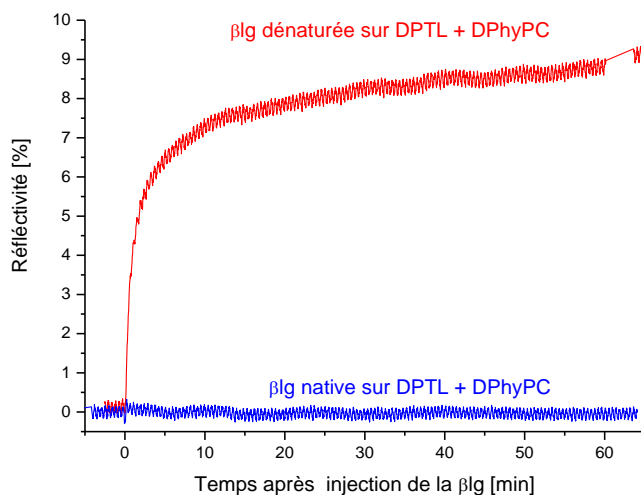


Figure 7 : Cinétiques d'adsorption de la BLG native ou partiellement dénaturée sur une bicouche (DPTL-DPhyPC) mesurées par spectroscopie de plasmon de surface.

Pour étudier l'influence de la compacité de la membrane lipidique sur l'adsorption de la protéine, des mesures à l'interface air-liquide ont été réalisées en utilisant une cuve de Langmuir couplée à des mesures de microscopie à l'angle de Brewster. Dans un premier temps, les isothermes d'adsorption d'une monocouche de DPhyPC (1,2-di-O-phytanyl-sn-glycero-3-phosphocoline) à l'interface air-eau ont été aussi enregistrées à l'aide de la cuve de Langmuir. Puis des mesures de microscopie à l'angle de Brewster ont été réalisées pour certaines valeurs de pression de surface afin d'observer l'organisation de ces monocouches à l'échelle de quelques micromètres. Les figures 8 et 9 présentent ces isothermes ainsi que les mesures de microscopie. Les mesures ont permis de définir deux conditions d'ajout de la protéine sur des monocouches plus ou moins compactes de DPhyPC.

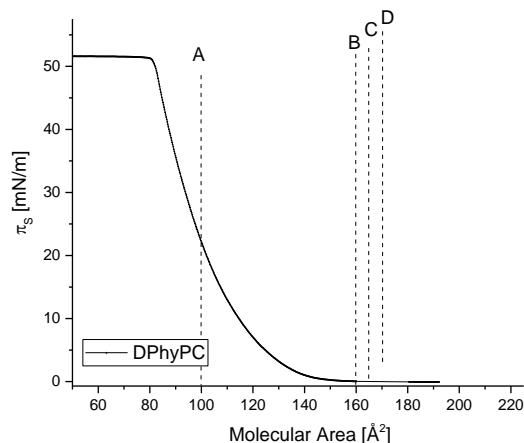


Figure 8 : Isotherme du DPhyPC (vitesse de compression  $10 \text{ \AA}^2/(\text{molécule} \cdot \text{min})$ ).

Les isothermes permettent d'observer plusieurs régimes :

- ✓ une interface avec une organisation de type gaz – liquide pour les valeurs élevées de l'aire de la surface par molécule ( $200 \text{ à } 150 \text{ \AA}^2$ ) et des valeurs quasi-nulles de la tension superficielle,
- ✓ puis un régime de type liquide condensé à partir de  $140 \text{ \AA}^2$  par molécule et des tensions superficielles plus importantes.

Des mesures de microscopie (figure 9) ont été enregistrées pour certaines valeurs de la tension superficielle (A à D, correspondant à des valeurs entre 22 mN / m et 0 mN/ m).

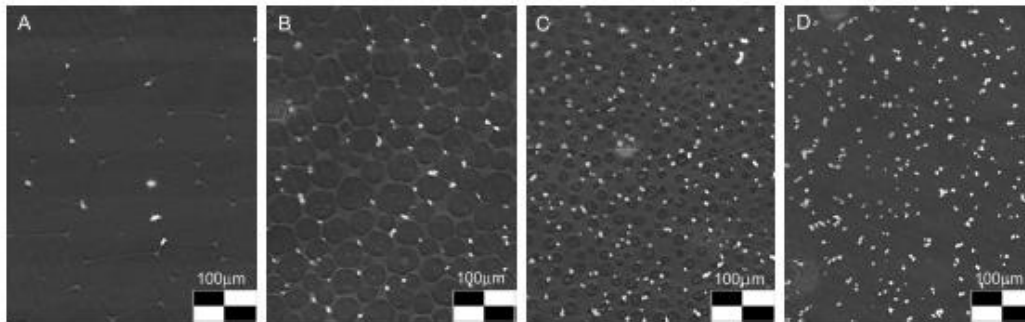
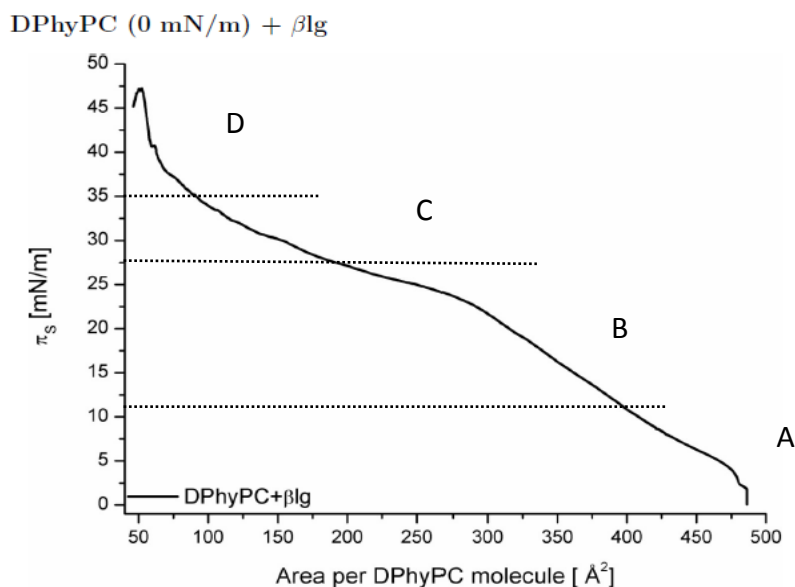


Figure 9 : Clichés de microscopie à l'angle de Brewster de monocouches de DPhyPC à différentes tensions superficielles : A 22 mN/m ( $A_M = 100 \text{ \AA}^2$ ) ; B 0,1 mN/m ( $A_M = 160 \text{ \AA}^2$ ) ; C 0 mN/m ( $A_M = 165 \text{ \AA}^2$ ) ; D 0 mN/m ( $A_M = 170 \text{ \AA}^2$ ).

Pour les premières mesures dans les conditions de phase de type gaz-liquide (A) des bulles (structure d'une mousse) sont observées avec des tailles de plus en plus faibles lorsque l'on augmente la compression. Pour une compression encore plus importante (C et D) les bulles fusionnent et des agrégats apparaissent, sans pour autant augmenter en taille après le collapse des bulles (D).

Ces deux mesures ont permis de sélectionner deux conditions extrêmes (A et D) pour lesquelles la monocouche de lipides est plus (D : phase liquide condensée) ou moins (A : phase gaz -liquide) compacte. Ces deux conditions ont été utilisées pour observer l'effet de cette compaction (donc de la densité de la monocouche de lipides) sur le comportement interfacial de la protéine.

Une monocouche de DPhyPC très peu dense (barrières de la cuve de Langmuir totalement écartées) a été formée sur une couche d'eau. Après l'étalement des lipides, la solution de protéines est injectée dans cette monocouche, donc à une pression de surface initiale de 0 mN/m (condition A précédente). Puis l'isotherme de cet ensemble (DPhyPC peu dense + BLG) et des mesures de microscopie ont été réalisées (Figure 10).



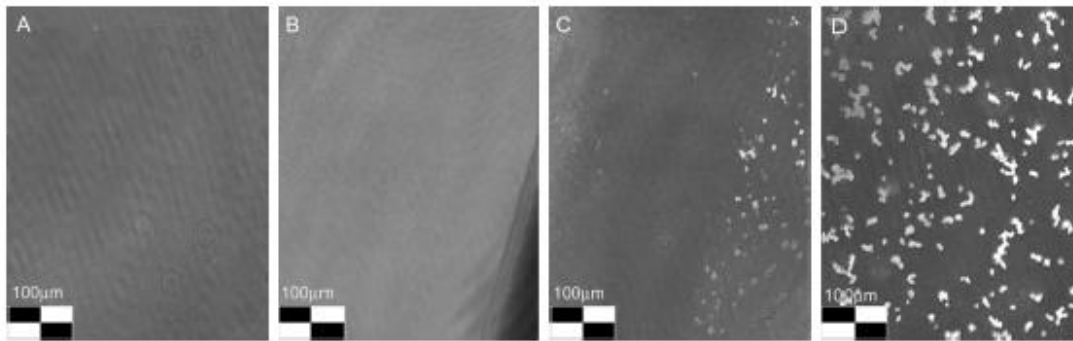


Figure 10 : Isotherme d'adsorption de la BLG sur une monocouche de DPhyPC avec une organisation très peu dense (pression initiale 0mN/m) et microscopie pour des valeurs de pression de surface inférieures à 11mN/m (zone A); inférieures à 28,6mN/m (zone B); inférieures à 35mN/m (zone C) et supérieures à 35mN/m (zone D).

Au début de la compression le comportement de la bicouche se rapproche de celui de la protéine à l'interface air-liquide, c'est-à-dire que l'épaisseur de la couche de protéine augmente (diminution du niveau de gris en microscopie entre A et B). Puis, au fur et à mesure de l'augmentation de la compression (C et D), l'épaisseur de la couche de protéines devient plus faible (le niveau de gris ré-augmente entre B et C) et au final on observe les agrégats de lipides (D), comme si la protéine avait alors été chassée de l'interface.

Si la solution de protéines est introduite dans une monocouche de lipides déjà dense (phase condensée liquide), c'est-à-dire déjà compressée à une pression de surface de 29mN/m (avant injection de la protéine), une légère augmentation de la pression interfaciale est mesurée dans les premières minutes (40 minutes-insert de la figure 11), puis la pression diminue.

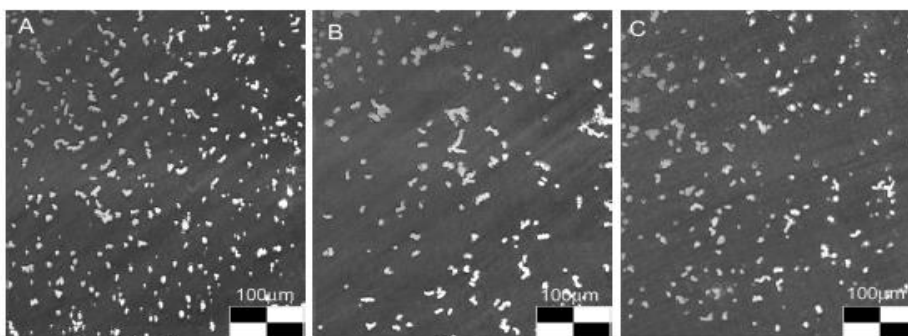
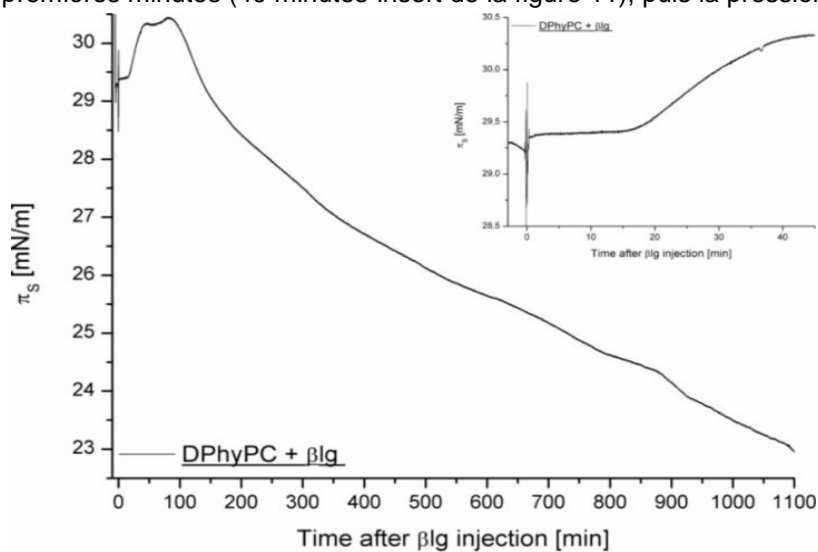


Figure 11 : Suivi de la tension superficielle d'une monocouche de DPhyPC (initialement à 29 mN/m après injection de la BLG) et images de microscopie de ce mélange DPhyPC-BLG au cours du temps : A : 29 mN/m (t=0), B : 29,3 mN/m (après 45 minutes), C : 22,2 mN/m (après 19h).



Les images enregistrées par microscopie au cours du temps montrent que l'agrégation des lipides diminue légèrement ainsi que le niveau de gris. Ceci pourrait indiquer qu'au fil du temps les protéines peuvent intégrer la monocouche de lipides.

Pour résumer, grâce à la mise en place de différentes membranes modèles, nous avons pu étudier le comportement de la beta-lactoglobuline et sa structure à des interfaces lipide-eau et à des interfaces air-eau. Ces observations et la mesure des épaisseurs des films interfaciaux, selon le pH, la charge des lipides et de la protéine, la compaction de la couche de lipides, la présence d'une monocouche hydrophobe ou d'une bicouche amphiphile renseignent sur les propriétés émulsifiantes et moussantes de cette protéine.

### 2.1.2 Effet des hautes pressions

Parmi les technologies apparues ces dernières années pour préserver les aliments ou obtenir de nouvelles qualités organoleptiques (couleur, saveur, texture...), le procédé des hautes pressions (HP) est l'un des plus prometteur et utilisé [Messens, 1997]. Cependant, il est aussi possible d'initier suite à l'application de la pression, des mécanismes de déstabilisation des ingrédients des aliments qui sont importants dans les qualités organoleptiques finales des produits [Torres, 2005 ; Oey, 2008]. Par exemple, en fonction du couple pression-durée d'application, sur certains aliments, comme les produits carnés ou les produits de la mer, des effets indésirables tels que l'oxydation des lipides et/ou des protéines, ainsi que des changements de couleur ou l'apparition d'arômes particuliers peuvent se produire [Cruz-Romero, 2004; Schindler, 2010; Medina-Meza, 2014]. La maîtrise de ces phénomènes et leur correction nécessitent de :

- ✓ déterminer leur origine à l'échelle moléculaire,
- ✓ connaître les mécanismes d'action des molécules (antioxydants ou nitrites) qui sont couramment ajoutées aux aliments pour les inhiber.

Certaines études précédentes, portant sur l'application des hautes pressions sur la viande, se sont ainsi focalisées sur l'ajout de molécules antioxydantes (nitrites, acide rosmarinique...) telles que les extraits de romarin ou de sauge pour réduire l'oxydation des lipides [Alves, 2010]. D'autres études ont été faites sur l'impact des conditions physicochimiques, telles que le pH ou la force ionique, sur la couleur de la viande et plus particulièrement sur la myoglobine (protéine modèle de la viande) et sa dénaturation [Holmgaard, 2012]. Dans tous les cas, ce sont des études menées au niveau macroscopique qui doivent être complétées par la compréhension à l'échelle moléculaire des effets des antioxydants ou des changements de couleur se produisant lors de l'application des hautes pressions.

Les principaux effets des hautes pressions sur la structure et les interactions protéiques dépendent de la gamme de pression appliquée. D'une manière générale, la gamme de pressions utilisée en agroalimentaire se situe entre 50 et 4500 bar (basses et moyennes pressions), car elle correspond à la gamme de pression que l'on peut atteindre dans les enceintes de traitement existantes. Les pressions appliquées sur les protéines globulaires, mènent à des états partiellement dénaturés avec une modification de l'hydratation de la protéine, une pénétration d'eau dans d'éventuelles cavités internes, une perturbation du site actif et des liaisons hydrogène [Frye, 1998; Yang, 2001; Roche, 2012; Chen, 2017]. Nous avons mené une étude comparative de l'impact de la pression sur deux protéines globulaires, dont l'une possède une cavité hydrophobe vide (la beta-lactoglobuline) et l'autre une cavité remplie d'une porphyrine (la myoglobine).

Nous avons utilisé la diffusion de neutrons aux petits angles pour évaluer les rayons de giration ( $R_g$ ) de ces deux protéines globulaires en fonction de la pression. Dans la gamme de moyenne pression, il est clair que la structure de la myoglobine est peu affectée tandis que le rayon de giration de la beta-lactoglobuline augmente sous pression. Pour cette dernière, nous avons attribué ce changement de rayon de giration au gonflement de la protéine suite à l'entrée d'eau dans la protéine due à la pression (cf. figure 12).



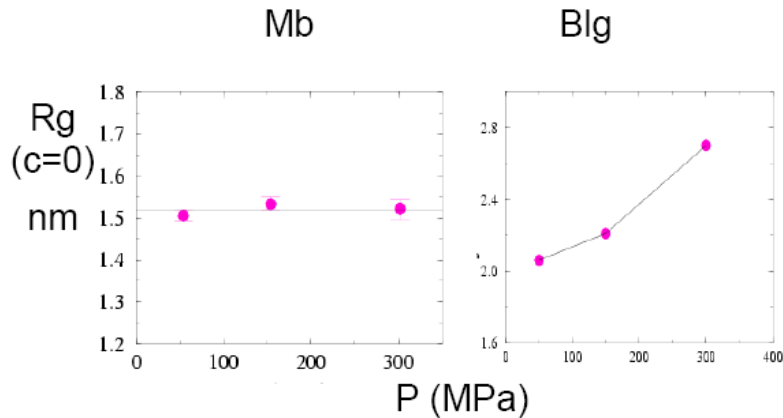


Figure 12: Evolution des rayons de giration de la myoglobine et de la beta-lactoglobuline en fonction de la pression. Mesures réalisées sur le spectromètre de diffusion de neutrons aux petits angles PACE du LLB.

Aujourd'hui, il est connu que les cavités hydrophobes présentes dans les protéines jouent un rôle clé dans les réarrangements de structure des protéines notamment via l'eau de solvatation qui en pénétrant par la pression dans ces cavités pourraient faire gonfler la structure protéique avant de la dénaturer complètement. La différence de comportement observée entre la myoglobine et la beta-lactoglobuline sur cette étroite gamme de pression peut s'expliquer par la présence de la cavité hydrophobe de la BLG.

Pour aller plus loin dans la compréhension des paramètres clé de la dénaturation des protéines globulaires par haute pression, nous avons commencé une étude du rôle des ligands ou des poches hydrophobes dans trois protéines: la beta-lactoglobuline (avec ou sans ligand), la myoglobine (avec différents ligands) et l'apomyoglobine (myoglobine exempte de son hème). Cette étude a été menée en étroite collaboration avec le centre de neutrons de Munich (Dr. Marie Sousai Appavou, JCNS-MLZ) et le laboratoire Léon Brillouin. En effet, l'une des tâches d'un contrat européen sur les neutrons (NMI3) piloté par le Laboratoire Léon Brillouin (Dr. Annie Brûlet, pilote du JRA, « Joint Research Activity on Advanced neutron tools for soft and biomaterials »), portait sur la mise en place d'un environnement-échantillon spécifique pour l'étude de la pression sur les échantillons biologiques. L'un des objectifs de cette tâche était de construire une cellule-pression permettant de réaliser des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles allant jusqu'à 6000 bar sur de petits volumes d'échantillons biologiques. Au début de ce contrat européen une cellule de pression allant jusqu'à 5000 bar avait été développée à Munich par Marie Sousai et Henrich Frielinghaus, tous deux participants au JRA. Le design de cette cellule est copié de celui qui a été utilisé pour construire la cellule-pression du PSI [Kohlbrecher, 2007]. Cela dit, lors des expérimentations à Munich, des fuites sur les joints de la cellule ne nous ont pas permis d'aller au-delà de 1500 bar.

Dans un premier temps nous avons travaillé sur la beta-lactoglobuline en présence et en absence de rétinol (ligand hydrophobe qui remplit la cavité hydrophobe de la protéine). Nous avons observé l'effet de la pression sur la protéine avec et sans son ligand par diffusion de neutrons aux petits angles (Spectromètre KWS2, à Munich, en collaboration avec Marie-Sousai Appavou). Les résultats ont montré que la beta-lactoglobuline en présence de son ligand hydrophobe, le rétinol, était moins sensible à la pression qu'en son absence. En effet, comme le montre la figure 13 et le tableau 1, lors de l'application d'une pression de 1500 bar, le rayon de giration de la protéine change beaucoup moins en présence de rétinol qu'en son absence. Ce résultat confirme l'importance des cavités hydrophobes dans la sensibilité à la pression de protéines globulaires.

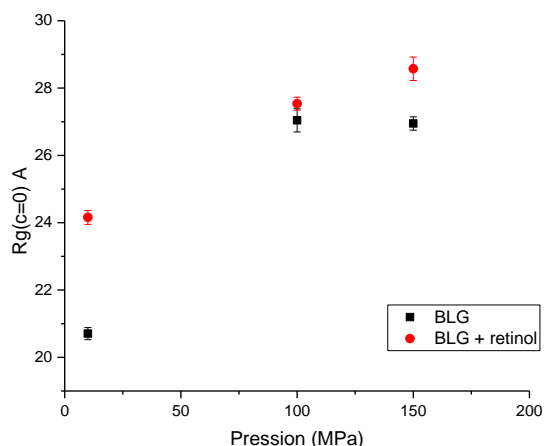


Figure 13: Evolution de rayon de giration de la BLG sans et avec ligand en fonction de la pression

Tableau 1: Rayon de giration de la beta-lactoglobuline avec et sans rétinol en fonction de l'application de la pression

Echantillon	Rg (Å) 100 bar	Rg (Å) 1000 bar	Rg(Å) 1500 bar	$\Delta$ Rg (Å) Entre 100 et 1500 bar
BLG sans retinol	20,7	27,05	27	<b>+ 6,3</b>
BLG avec retinol	24,15	27,53	28,6	<b>+ 4,45</b>

La présence de ligand dans la cavité hydrophobe de la BLG semble donc la protéger de la pression. Il serait intéressant d'appliquer des pressions plus élevées pour observer d'autres étapes de la dénaturation de la protéine. Pour compléter ce travail préliminaire sur la relation cavité-ligand et effet de la pression (à basse pression), nous avons réalisé des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles, au Laboratoire Léon Brillouin avec la nouvelle cellule de pression développée par Burkhard Annighofer, toujours dans le cadre du JRA. Cette cellule nous a permis de faire des mesures sur la myoglobine jusqu'à 6000 bar.

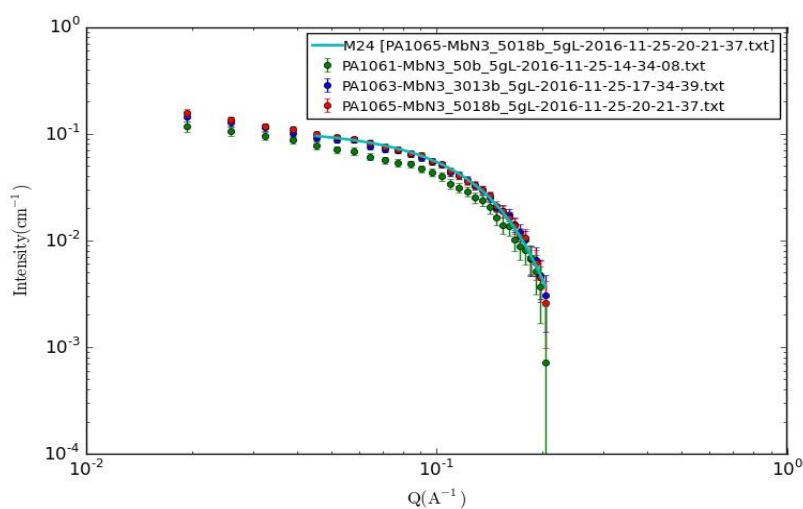


Figure 14 : Spectres de diffusion aux petits angles de MbN3 (azidometmyoglobine) en fonction de la pression (de 50 à 5000 bar).

Comme le montre la figure 14, pour l'azidometmyoglobine (MbN3), c'est-à-dire pour la myoglobine associée à un de ses ligands les plus stables, nous n'avons pas observé d'évolution du rayon de giration de la protéine jusqu'à 5000 bar (figure 14). D'autres mesures ont été réalisées sur l'aquometmyoglobine (ligand beaucoup moins stable que l'azido) sur ces mêmes gammes de pression. Dans ce cas, nous avons observé un effet de la pression avec un phénomène d'agrégation réversible dès 3000 bar (figure 15). Avec ces expériences nous avons donc confirmé que le ligand de la protéine a un effet sur sa stabilité.

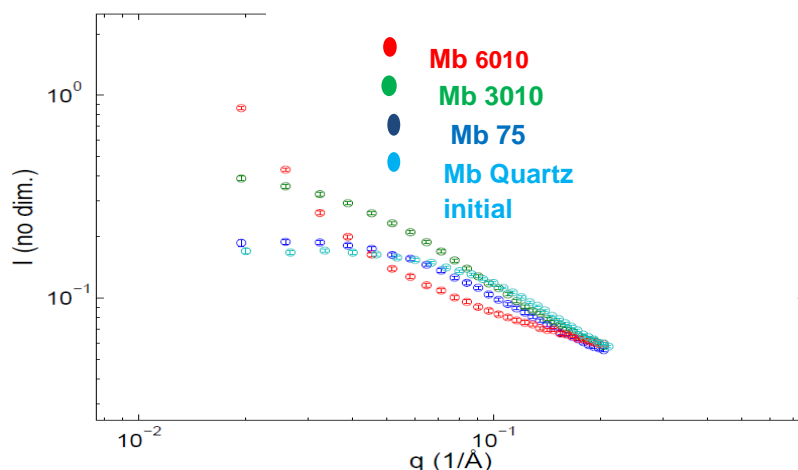


Figure 15 : Spectres de diffusion aux petits angles de Mb (aquometmyoglobine) en fonction de la pression (de 50b à 6000 bar).

Pour compléter ces approches structurales, nous avons mené une étude sur l'effet de la pression sur la structure et la dynamique de la beta-lactoglobuline avec des collègues italiens de l'Université d'Ancône. Sur une gamme de pression allant de 100 à 3000 bar, nous avons observé la beta-lactoglobuline à pH3 (pour être en monomère) par diffusion de neutrons aux petits angles, et par diffusion quasi-élastique de neutrons. Les mesures de diffusion de neutrons aux petits angles ont montré que la protéine se dépliait à 2800 bar, son rayon de giration passe de 16,5 Å (monomère) à 23 Å. La représentation de Kratky de la figure 16 indique aussi un changement de forme de la protéine à 2800 bar.

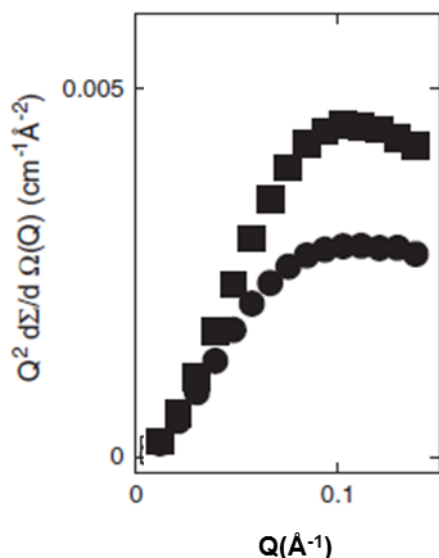


Figure 16: Représentation de Kratky des données de diffusion de neutrons obtenues pour des solutions de BLG à pH3 (carré : atmosphérique et rond : 2800 bar). (Spectromètre PACE, Laboratoire Léon Brillouin). La forme en cloche observée à pression atmosphérique (allure classique pour les protéines globulaires) tend à devenir aplatie à 2800 bar (allure classique pour les protéines dépliées).

Des expériences de diffusion quasi-élastique de neutrons ont été menées pour étudier la dynamique de la protéine native et dépliée sous pression (2800 bar). Les résultats montrent que la fraction de protons immobiles sur des temps d'observation de l'ordre de la picoseconde diminue pour la protéine à 2800 bar (de 0,88 à 0,73), ce qui semble indiquer qu'elle est moins rigide sous sa forme dépliée (cf figure 17).

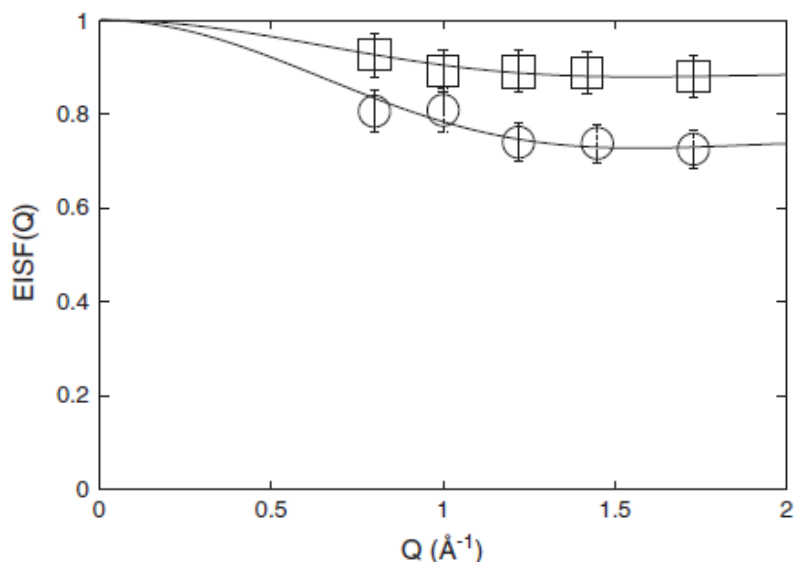


Figure 17: Facteur de structure élastique incohérent en fonction de la pression (carrés : pression atmosphérique; ronds : 2800 bar). Les traits continus représentent les ajustements.

A partir de ces mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons, un coefficient de diffusion translationnel interne peut être déterminé. Le tableau 2 suivant présente la valeur de ce coefficient en fonction de la pression.

Tableau 2: Valeur du coefficient de diffusion translationnel mesuré par diffusion quasi-élastique de neutrons en fonction de la pression.

Pression	Atm	1300 bar	2800 bar
$D_{trans,NS}$ ( $10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /s)	$10,4 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,3$	$9 \pm 0,2$

Ce coefficient diminue sous pression, probablement à cause du dépliement de la protéine qui favorise l'agrégation de la protéine et diminue le coefficient de diffusion translationnel interne.

### 2.1.3 Séchage et réhydratation

Parmi les aliments, les produits secs sont extrêmement recherchés. En effet, ils permettent d'avoir une durée de conservation à température ambiante plus longue que les produits liquides, et souvent sous un volume minimal, facilitant ainsi leur emballage et leur transport. Cependant, même si les problèmes ne sont pas comparables à ceux des produits liquides, il existe de nombreux phénomènes modifiant aussi bien la présentation, l'aspect des produits secs et leur fonctionnalité au cours des phases de déshydratation et de stockage. Ces phénomènes sont souvent induits par la présence d'eau résiduelle au sein du système, eau qui peut réorganiser la structure par des interactions moléculaires et moduler ainsi la fonctionnalité lors de l'utilisation du produit.

La formulation du matériel ou le respect des conditions de séchage particulières sont des paramètres essentiels à la fonctionnalité des matrices d'intérêt. Le plus souvent, les protéines solubles dans l'eau sont repliées en une structure possédant un coeur non polaire. Cependant, la présence d'eau est d'une importance fondamentale pour leur structure et pour leur fonction [Rupley, 1991]. La mobilité de l'eau à proximité de la surface de la macromolécule est réduite par rapport à celle de l'eau solvant (dite eau "bulk") [Halle, 2004]. Néanmoins, ce pool d'eau en interaction avec la surface est d'une

importance considérable puisqu'il va permettre la mobilité de la macromolécule au moins à l'échelle locale, ainsi que le transfert de protons à la surface, qui sont les deux conditions nécessaires à la fonctionnalité d'une protéine

Le maintien de la stabilité (structurale et fonctionnelle) des protéines au cours du séchage est assuré à deux niveaux :

- ✓ par un travail de formulation. Par exemple, l'ajout d'un support (encore appelé co-soluté, excipient ou protectant selon le domaine considéré) qui permet de structurer la matrice alimentaire préservant l'intégrité du produit par modification des interactions avec les molécules d'eau ;
- ✓ par une sélection des conditions de séchage qui conditionnera la distribution de l'eau au sein de la structure ainsi que la déshydratation du système.

La lyophilisation, qui associe une étape de congélation avant sublimation de l'eau, est le procédé le plus efficace pour conserver la structure moléculaire des protéines. Aujourd'hui encore l'étude de la structure et de la dynamique de systèmes alimentaires complexes secs est loin d'être maîtrisée. Il semble que des éléments, comme l'eau, et les sucres (lactose par exemple pour les poudres de lait), même en petite quantité, sont capables de modifier complètement l'aspect et la fonctionnalité des aliments, à toutes les étapes de la vie du produit (formulation, déshydratation, conservation, utilisation) [Champion, 2011].

Des protéines du lait (beta-caséine, beta-lactoglobuline) ont été isolées à partir d'une poudre de lait Low Heat ou du lait de vache frais. Ces protéines purifiées ont été séchées par lyophilisation en utilisant différents cosolutés (NaCl ou saccharose). Nous avons utilisé la diffusion élastique et inélastique de neutrons pour caractériser la dynamique de l'eau dans des poudres peu hydratées ou stockées dans des conditions diverses. En complément de la diffusion de neutrons, des analyses par calorimétrie différentielle, spectroscopie infrarouge nous ont permis de caractériser d'autres niveaux de structure et de dynamique de ces protéines. L'objectif de l'ensemble de ces mesures est de mieux comprendre le rôle de l'eau résiduelle, de sa mobilité sur la structure et la dynamique de protéines dans des milieux peu hydratés, protéines isolées, en présence d'autres protéines, ou de co-solutés (sels ou sucres).

Dans le cadre du master Erasmus de Matteo Guimerio, nous avons étudié la beta-lactoglobuline. Les solutions de protéine purifiée ont été lyophilisées en présence de co-solutés (NaCl, saccharose) ou d'eau. Les mesures de calorimétrie différentielle à balayage menées sur ces échantillons, nous ont permis de montrer que l'étape de lyophilisation pouvait être dénaturante pour les protéines. La figure 18 présente les thermogrammes obtenus sur des échantillons de protéines avant et après lyophilisation, en absence ou en présence de NaCl. L'absence de pic endothermique sur les échantillons ne contenant pas de NaCl avant et après lyophilisation indique qu'un co-soluté est nécessaire pour maintenir la structure de la protéine au cours du séchage.

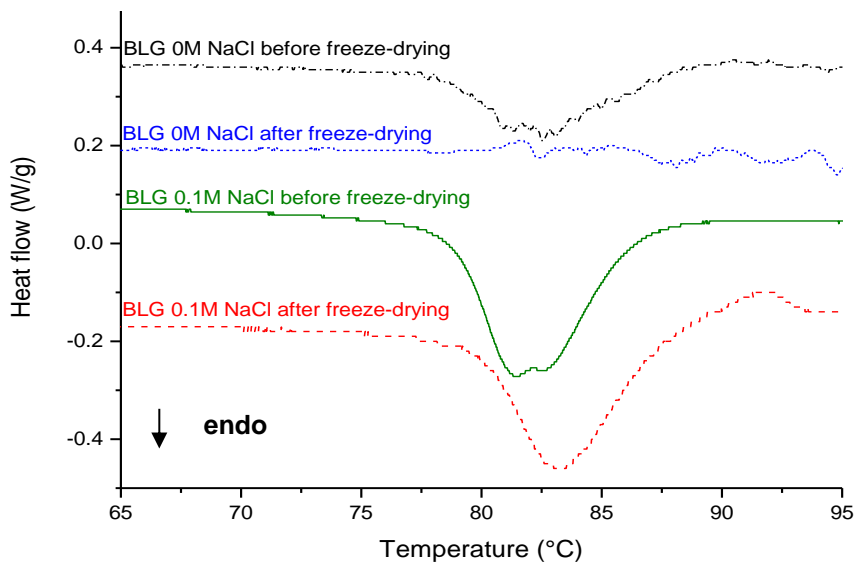


Figure 18: Effet de la lyophilisation sur la structure de la BLG : mesures de calorimétrie.

Nous avons recherché quelle pouvait être la quantité d'eau nécessaire à l'apparition de mobilité sur la protéine, et si cette mobilité était associée à la mobilité du solvant. Nous avons donc réalisé les isothermes de sorption d'eau sur des poudres de beta-lactoglobuline (figure 19).

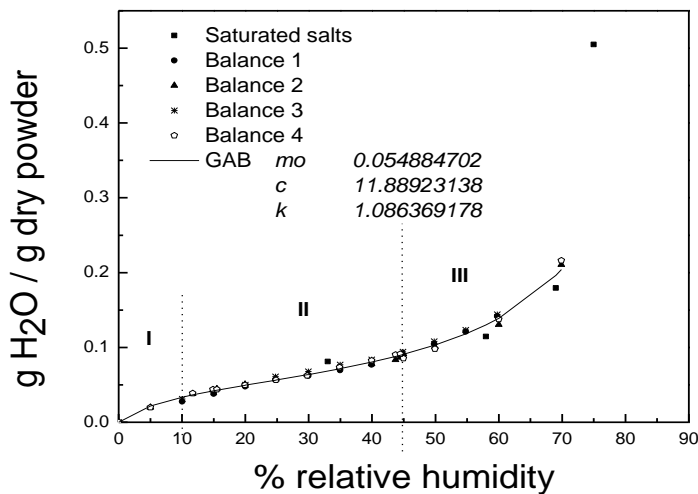


Figure 19: Isotherme d'adsorption d'eau par des poudres de BLG équilibrées contre de l'eau en utilisant différents outils (balance de sorption et solutions de sels saturés)

Les résultats obtenus en utilisant différentes méthodes (équilibre contre des solutions de sels saturés ou balance) sont les mêmes, ce qui indique que les échantillons étaient bien à l'équilibre. Trois zones distinctes sont observées sur ces isothermes. La zone I correspond à la zone de teneur en eau pour laquelle une monocouche d'eau se forme sur la poudre. La zone II correspond à la gamme de teneur en eau pour laquelle il y a adsorption d'eau sur la monocouche, puis une zone III pour laquelle de l'eau sous forme liquide (eau solvant) commence à être présente. Ces données ont été ajustées selon le modèle GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer) en utilisant l'équation suivante :

$$m = m_0 \cdot c \cdot k \cdot a_w / [(1 - k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w + c \cdot k \cdot a_w)]$$

Où :

$m$ : teneur en eau à l'équilibre (g d'eau pour 100 g de poudre sèche)

$m_0$ : teneur en eau pour obtenir la monocouche (g d'eau pour 100 g de poudre sèche)

$a_w$ : activité de l'eau (humidité relative /100)

$c$ : constante associée à l'enthalpie d'adsorption de la monocouche

$k$ : constante associée à la chaleur d'adsorption d'une multicouche

Grâce à cet ajustement des courbes de sorptions expérimentales, nous avons pu déterminer qu'une monocouche correspond à une teneur en eau de 5,5 g d'eau pour 100 g de poudre de BLG. Ainsi pour étudier la relation entre quantité d'eau sorbée et mobilité de la protéine, nous avons choisi d'équilibrer les poudres à trois teneurs en eau correspondant à ces trois zones : la monocouche ou la zone I (8g d'eau pour 100 g de poudre sèche), la multicouche ou la zone II (11 g d'eau pour 100 g de poudre sèche) et la zone avec de l'eau diluante zone III (50 g d'eau pour 100 g de poudre sèche).

Nous avons dans un premier temps observé par calorimétrie la présence (ou pas) d'eau congelable pour les différents échantillons (Figure 20).

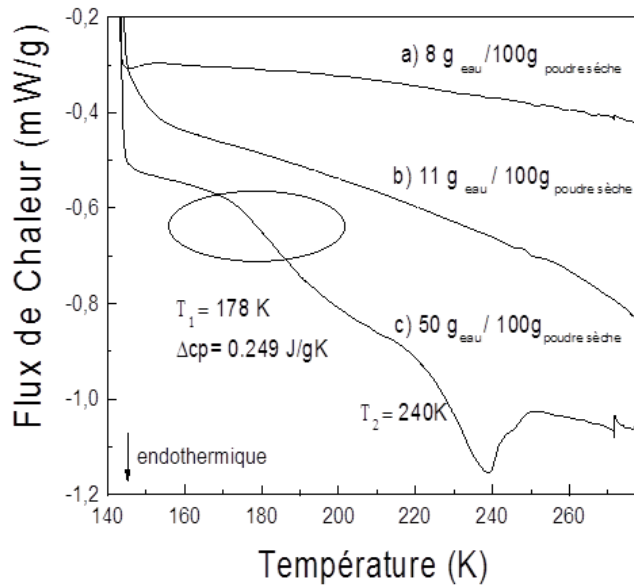


Figure 20: Thermogrammes de poudres de BLG équilibrées à différentes teneur en eau.

Les thermogrammes des poudres équilibrées avec une monocouche d'eau (8g d'eau pour 100 g de poudre sèche, a) et à 11g d'eau pour 100 g de poudre sèche (b) ne présentent aucun évènement thermique à basse température. Seule la poudre équilibrée à 50 g d'eau pour 100 g de poudre sèche, présente un pic endothermique à 240 K et un saut de chaleur spécifique à 178 K. Le pic endothermique observé à 240 K correspond probablement à la fusion de l'eutectique de NaCl (rajouté pour la lyophilisation) et d'eau congelable. Quelle est l'origine du saut de chaleur spécifique observé à 178 K ? Est-il associé à un changement de mobilité de l'eau ou de la protéine, ou du couplage des deux eau-protéine.

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des mesures de diffusion incohérente de neutrons élastique et inélastique (dynamique picoseconde) sur deux types d'échantillons. Des échantillons de poudre de BLG hydrogénée (BLG-H) et des échantillons de poudre de BLG avec les protons de la protéine échangés contre des deutériums (BLG-H/D). La poudre hydrogénée est réhydratée avec de l'eau, ce qui permet d'observer la dynamique de la protéine et de sa (ou ses) couche (s) d'hydratation. La poudre échangée (BLG-H/D) est réhydratée dans du D<sub>2</sub>O. Dans ce cas, les mouvements observés par diffusion élastique et inélastique de neutrons sont ceux des protons de la protéine. Une expérience de diffusion incohérente de neutrons reflète la variation d'intensité diffusée en fonction de deux paramètres principaux l'énergie ( $\omega$ ) et l'angle ( $q$ ). En ne prenant en compte que la contribution des hydrogènes (du fait de leur important coefficient de diffusion incohérente), le facteur de structure dynamique,  $S(q, \omega)$ , peut être décomposé en plusieurs contributions dites élastique, quasi-élastique et inélastique selon l'équation suivante:

$$S(q, \omega) = \text{DWF}(q, T) [\text{EISF}(q) \delta(\omega) + (1 - \text{EISF}(q)) S_{\text{qel}}(q, \omega)] + \text{DWF}(q, T) [q^2 / (8\pi M \omega)] \eta(\omega, T) g(\omega)$$

Dans cette équation :

DWF ( $q, T$ ) est le facteur de Debye Waller,

EISF ( $q$ ) est le facteur de structure élastique incohérent,

$S_{\text{qel}}(q, \omega)$  représente l'intensité diffusée non-élastique centrée à  $\omega=0$

$M$  est la masse du proton,

$\eta(\omega, T)$  est le facteur de Bose,

$g(\omega)$  est la densité d'états vibrationnels.

Le premier terme de l'équation, qui contient la diffusion élastique, donne des informations sur le nombre de protons mobiles (intensité intégrée). La deuxième partie, dite quasi-élastique,  $S_{\text{qel}}(q, \omega)$ , correspond à des mouvements non vibrationnels, de type diffusifs. Le dernier terme, représente la diffusion inélastique qui correspond aux modes vibrationnels dont la densité est  $g(\omega)$ .

Nous avons réalisé des mesures de diffusion élastique de neutrons sur le spectromètre IN13 à l'Institut Laue Langevin (ILL) à Grenoble en collaboration avec Daniela Russo. La résolution en énergie de cet instrument était de 8  $\mu\text{eV}$  ce qui correspond à l'observation de mouvements plus rapides que 80 ps. Les mesures ont été enregistrées sur des poudres de BLG hydrogénées et

échangées réhydratées à 50g d'H<sub>2</sub>O ou de D<sub>2</sub>O pour 100 g de poudre sèche sur la même gamme de température que pour les mesures de calorimétrie. La figure 21 présente les résultats obtenus pour deux échantillons hydratés et pour la protéine avec la monocouche d'hydratation (8g d'D<sub>2</sub>O pour 100g de poudre échangée).

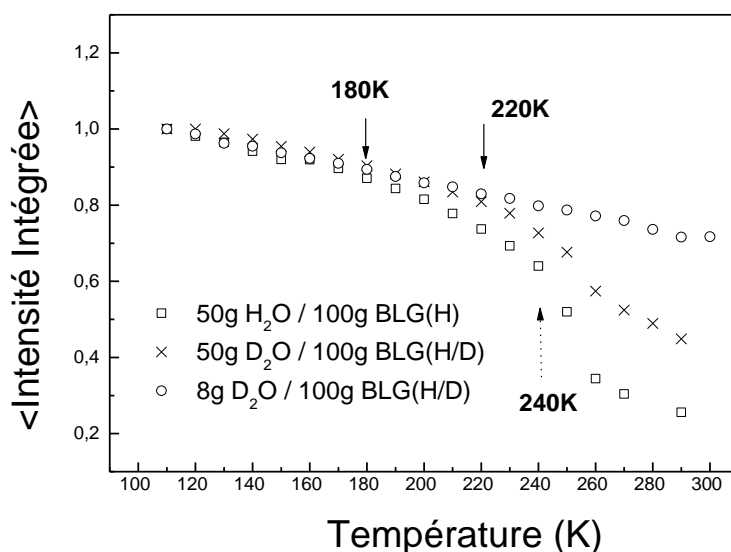


Figure 21: Intensité intégrée obtenue à partir des spectres de diffusion élastique pour les différentes poudres de BLG (hydrogénée ou échangée) plus ou moins hydratées.

Ces données nous montrent que l'échantillon le moins hydraté (avec la monocouche d'hydratation) ne présente pas de transition dynamique visible sur cette gamme de temps (centaine de picosecondes). Par contre, pour les deux échantillons hydratés, des transitions dynamiques sont observées. Dans le cas de l'échantillon hydrogéné (pour lequel nous observons donc plus particulièrement la dynamique de l'eau), une première transition est observée à 180 K, puis une autre à 240 K. Dans le cas de l'échantillon échangé (pour lequel nous observons essentiellement la dynamique de la protéine), une première transition est observée à 220 K et une autre à plus haute température.

Pour aller plus loin dans l'observation et l'interprétation de l'origine de ces changements de dynamique sur cette gamme de temps des picosecondes, nous avons réalisé sur les mêmes échantillons des mesures de diffusion inélastique de neutrons sur le spectromètre à temps de vol, Mibémol du Laboratoire Léon Brillouin, avec Jean-Marc Zanotti. La longueur d'onde des neutrons utilisés était de 5,2 Å ce qui correspondait à une résolution du pic élastique de 150 µeV soit 30 ps. La figure 22 présente l'évolution des densités d'états vibrationnels en fonction de la température, enregistrées sur cette gamme de temps des picosecondes, pour les deux échantillons les plus hydratés, hydrogénés (a) ou échangés (b).

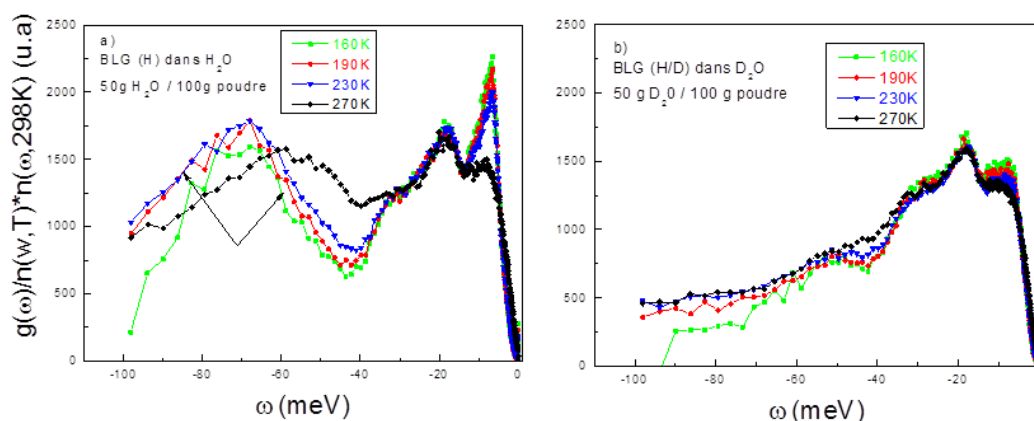


Figure 22: Densités d'états vibrationnels enregistrées par diffusion inélastique de neutrons.



Nous observons sur l'échantillon hydrogéné (dynamique de l'eau d'hydratation) aux plus faibles températures (a) une bande centrée à -70 meV qui est absente pour l'échantillon échangé (dynamique de la protéine). Cette bande est attribuée selon la littérature aux mouvements de libration de la glace hexagonale [Diehl, 1997]. Cette bande s'élargit à partir de 190K et se déplace vers -60meV au-dessus de 230K. Cette observation suggère donc que le changement dynamique observé lors des mesures de diffusion élastique sur IN13 à 180 K sur ce même échantillon, est bien en partie associé à un changement des mouvements vibrationnels de l'eau. Si l'on analyse maintenant l'évolution des densités d'état à plus faibles valeurs de transfert d'énergie (-30 meV à 0 meV), on note une évolution importante de la bande positionnée à -6,5 meV et cela dès 190 K encore une fois seulement pour l'échantillon hydrogéné (dynamique de l'eau). Dans la littérature [Li, 2002], cette bande est associée aux modes de vibrations collectifs du réseau de liaisons hydrogènes de la glace. En conclusion, il y a certainement un lien entre la transition vitreuse (changement de Cp) observée en calorimétrie à 180 K et la relaxation de l'eau. Cependant même si nous avons pu observer un changement dynamique de la protéine vers 220 K par diffusion élastique, nous n'avons pas observé de changement de modes vibrationnels dans cette gamme de temps des picosecondes sur la protéine. Cette transition est peut-être à rechercher sur une autre gamme de temps (ns). L'ensemble de ces mesures nous montre qu'il existe une relation forte entre la dynamique de l'eau résiduelle des échantillons et celle de la protéine. En complément de ces mesures, nous avons aussi mené des études par spectroscopie infrarouge haute résolution au synchrotron Soleil, sur le spectromètre AILES, sur l'effet de l'hydratation sur la structure de la protéine. En effet, il est important de connaître la relation entre mobilité moléculaire résiduelle et évolution de la structure de la protéine.

## *2.2. Imagerie neutronique appliquée à la Science des Aliments*

De septembre 2012 à septembre 2014, j'ai été en délégation au LLB pour y implanter un instrument d'imagerie de neutrons et développer son utilisation, entre autres, dans le domaine de l'agroalimentaire. Pendant ces deux années j'ai eu la responsabilité scientifique de ce nouvel instrument du LLB, IMAGINE. L'objectif principal du projet de délégation était d'amener une nouvelle communauté d'utilisateurs (chercheurs du domaine de la science des aliments, R&D des entreprises agroalimentaires, étudiants de master en science des aliments, ingénieurs agroalimentaires) vers la diffusion de neutrons, en réalisant un travail systématique sur des systèmes modèles (ceux présentés dans la partie précédente de ce bilan, par exemple) et aussi d'étendre notre travail de recherche à des matrices plus complexes et à des matériaux différents.

C'est le cas de l'étude de flux de liquides au travers de matériaux poreux, qui revêt une grande importance dans de nombreux domaines tels que la pétrologie, la géologie et l'archéologie. Différentes techniques d'imagerie (RX, RMN et neutrons) ont été développées pour visualiser le flux de liquide à travers ce type de matériaux et les effets sur les matériaux eux-mêmes dus à la diffusion. Parmi ces techniques, l'imagerie neutronique est une méthode non destructive, qui donne des informations sur la structure des matériaux et leur composition, en particulier sur leur densité et leur teneur en eau. L'imagerie neutronique est une technique qui, depuis son introduction dans les années 1960, a progressé depuis l'inspection qualitative non destructive à une méthode d'analyse quantitative. L'aptitude de l'imagerie neutronique à distinguer la présence d'eau dans les matériaux, grâce à la très grande section efficace de diffusion de l'hydrogène par rapport à celles d'autres atomes, en fait un outil idéal d'observation de la migration de l'eau là où d'autres techniques sont difficilement utilisables.

Lorsque nous avons commencé le projet d'installation d'une station d'imagerie au Laboratoire Léon Brillouin (2012-2014) dans le cadre du contrat franco-suédois de développement d'outils pour la future source de neutrons européenne ESS, très peu de mesures avaient été faites sur des échantillons relevant de la Science des aliments. Il nous est apparu évident que les applications de la nouvelle station IMAGINE au domaine agroalimentaire devraient être des éléments majeurs et originaux du cas scientifique développé.

Des études précédentes [Tanoi, 2009; Aregawi, 2013] avaient montré l'intérêt de cet outil pour rendre compte de l'effet de procédés (essentiellement le séchage) sur des matrices alimentaires complexes, telles que les poissons et les fruits. Tanoi et al ont été les premiers à utiliser l'imagerie neutronique

pour étudier le séchage de poissons et avaient montré qu'au cours du séchage, certaines zones du poisson restent très hydratées tandis que d'autres sont très rapidement déshydratées (figure 23) que le mode de séchage change beaucoup la répartition de l'eau.

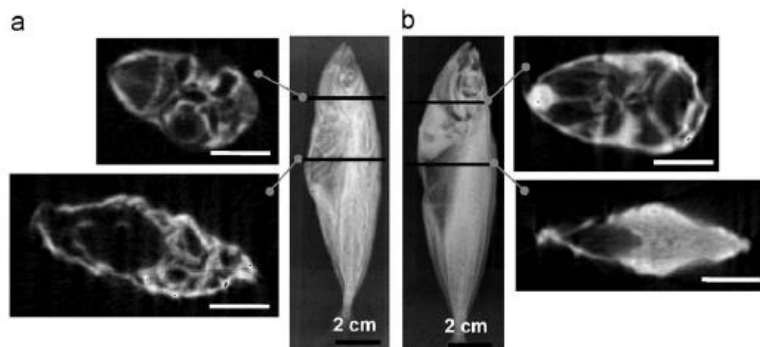


Figure 23: Images (au centre) de poissons (maquereaux) séchés par lyophilisation (a- à gauche) ou par étuvage classique (b- à droite). Coupes de reconstruction, en haut et au milieu du poisson, obtenues après des mesures de tomographie de neutrons [Tanoi et al, 2009].

Les systèmes choisis pour les études d'imagerie et de tomographie de neutrons au LLB, nous ont permis de faire des mesures de systèmes complexes, sur lesquels les observations macroscopiques avaient identifié des problèmes liés à l'hydratation: a) vitesse de réhydratation de poudres de lait préparées avec différentes formulations (en présence d'anti-agglomérants ou, au contraire, d'agents de libération retardée); b) perte de croustillant due à l'activité de l'eau dans des produits céréaliers extrudés plus ou moins riches en amidons et sucres; c) changements de la diffusion de l'oxygène et d'oxydation de vins en présence de bouchons de liège de différentes qualités, et changement de profils aromatiques de vins élevés dans des fûts dont les bois ont subi des traitements thermiques différents, et d) la cuisson de la viande.

### 2.2.1. Réhydratation des poudres de lait

Beaucoup de poudres alimentaires sont produites par atomisation. C'est le cas des poudres de protéines de lait qui sont utilisées par l'industrie agroalimentaire dans de nombreuses applications qui généralement nécessitent que la poudre se dissolve rapidement. Au moment du séchage, par le choix de la formulation (présence de d'anti-agglomérants, de sucres, de matière grasse...) ou des paramètres clé de la tour d'atomisation (teneur en matière sèche initiale, température de séchage, taille de la buse de sortie, flux d'air...), il est possible d'obtenir des poudres de qualités très diverses en termes de granulométrie, de solubilité, de fluidité ou même d'état physique des ingrédients qui les constituent (cristallin, amorphe...). Les conditions de séchage ont aussi un effet très important sur les évolutions éventuelles des poudres pendant le stockage, puis au cours de la réhydratation. Aujourd'hui, de nombreuses études sont encore menées pour mieux comprendre l'effet des différents paramètres de séchage sur la stabilité et les propriétés des poudres de lait et, plus généralement, des poudres de protéines [Schuck, 2002; Gaiani, 2010]. En science de l'aliment, les approches les plus classiques utilisent des outils qui permettent d'étudier l'état physique des ingrédients des poudres après le séchage ou en cours de stockage (par exemple, selon l'humidité relative ou la température). [Champion, 2011]. Ainsi, on utilise la calorimétrie, la granulométrie et la microscopie pour rendre compte des tailles de particules. Eventuellement, pour aller plus loin dans la compréhension et la caractérisation de la relation entre mobilité moléculaire (associée à l'eau ou aux macromolécules de la poudre) et les phénomènes d'agglomération, de mottage et de perte de solubilité, des expériences de résonance magnétique nucléaire bas champ ou de spectroscopie diélectrique sont aussi mises en œuvre [Champion, 2012]. Comme nous l'avons vu, notre approche à l'échelle moléculaire sur des systèmes modèles (une protéine lyophilisée en présence de différents sels et sucres...) a consisté à étudier la structure et la dynamique de cette protéine ou de l'eau.

Dans l'industrie agroalimentaire, et même dans l'industrie pharmaceutique, ce sont des tests assez empiriques qui sont le plus souvent utilisés pour qualifier les poudres en termes de solubilité au regard

de leur formulation ou de leurs conditions de séchage ou de stockage, par exemple, pour rendre compte de leurs vitesses de dissolution ou étudier les mécanismes de réhydratation (qui impliquent des étapes de mouillage, de gonflement et de désintégration des différentes particules de la poudre...). En revanche, nous avons étudié les étapes de réhydratation des poudres de lait par imagerie de neutrons, d'abord sur la station d'imagerie ICON de l'institut Paul Scherrer à Villigen (Suisse), en collaboration avec Anders Kaestner, responsable de cet instrument. Pour cela, nous avons préparé des tablettes de poudres de protéines de lait en présence de différents agents : de l'hydroxyméthylcellulose (HMC), connue pour retarder la libération de molécules d'intérêt encapsulées dans des tablettes, ou du lactose connu pour favoriser la désintégration de la tablette. Ensuite, nous avons réhydraté les tablettes en observant les cinétiques de réhydratation. La figure 24 présente le dispositif expérimental et un exemple d'image obtenue sur la station d'imagerie IMAGINE du LLB après sa mise en place en 2014.

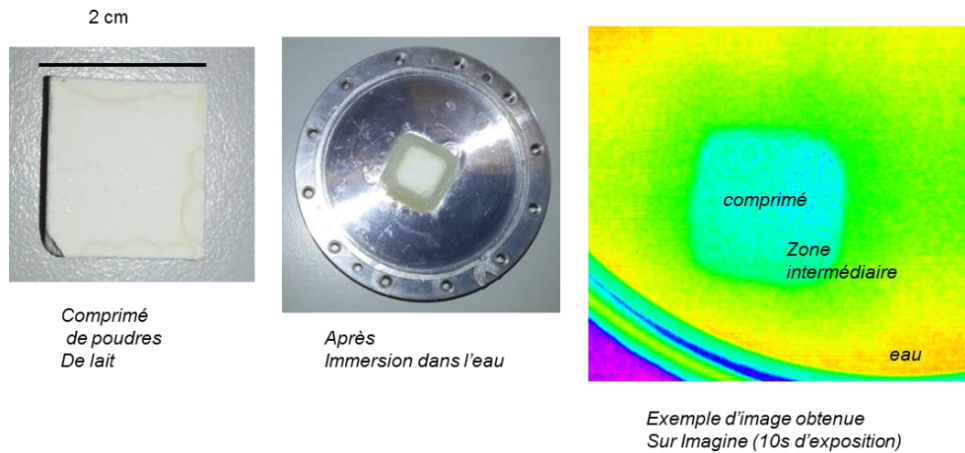


Figure 24: A gauche : tablette de poudre de lait; au centre : tablette (après réhydratation) dans la cellule utilisée pour réaliser les expériences d'imagerie; à droite : exemple d'image obtenue par imagerie de neutrons sur la station IMAGINE du LLB, après 10 secondes d'exposition.

Nous avons suivi la cinétique de réhydratation de trois tablettes de poudre de lait avec les trois formulations : référence sans aucun ajout, poudre de lait plus lactose et poudre de lait plus HMC. Nous avons pu observer que la tablette formulée en présence de HMC passait par une étape de gonflement, ce qui n'est pas le cas pour la référence (figure 25).

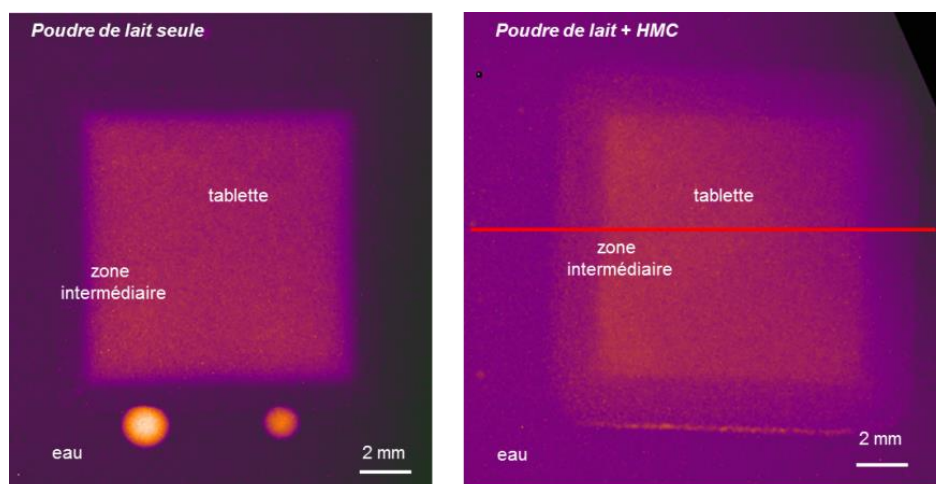


Figure 25: Images d'une tablette de lait (à gauche) et d'une tablette de lait formulée en présence d'hydroxyméthylcellulose (à droite) après quelques minutes de réhydratation.

Il est possible de quantifier le gonflement de la tablette en suivant les profils d'atténuation (trait rouge sur la figure 25) au cours du temps. Ces profils après une minute, 3h et 6h pour la tablette de poudre de lait formulée avec de l'HMC sont présentés sur la figure 26.

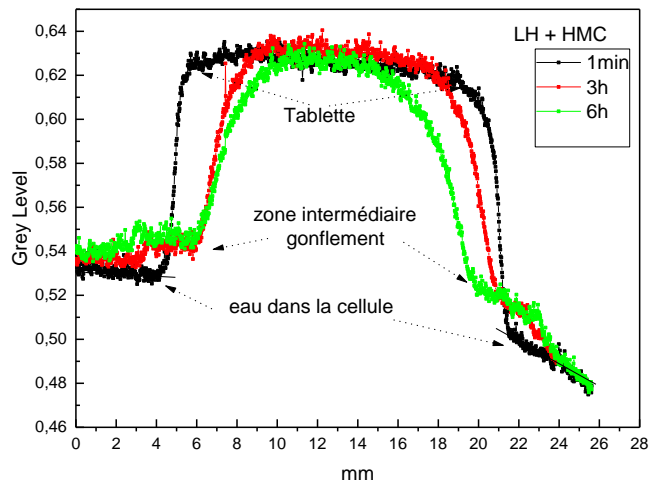


Figure 26: Evolution du profil de niveau de gris de la tablette de poudre avec de l'HMC au cours du temps.

Pour cette formulation (lait + HMC), après 6h de réhydratation, la zone de gonflement continue à augmenter et la tablette n'est toujours pas complètement dissoute. Pour la tablette de référence (lait), la zone de gonflement est très petite et la dissolution arrive après seulement 1h de réhydratation. Pour la tablette formulée en présence de lactose, la désintégration en morceaux est quasi instantanée après la réhydratation.

### 2.2.2. Stockage de produits céréaliers extrudés

En agroalimentaire, la relation porosité-hydratation peut se retrouver aussi bien dans la problématique du stockage des poudres que dans les effondrements de structure observés lors du séchage ou de la conservation de produits peu hydratés, tels que des morceaux de fruits ou de légumes secs. Les produits extrudés riches en amidons ou en protéines végétales sont aussi peu hydratés et très sensibles à la migration de l'eau. Selon les conditions d'extrusion tous ces produits ont des porosités différentes et leurs caractéristiques structurales peuvent être affectées par les conditions de stockage. La distribution d'eau dans le matériau peu hydraté et son suivi au cours du stockage est un critère déterminant pour les qualités organoleptiques [Assifaoui, 2006; Poirier-Brulez, 2006]. Par exemple, des pertes de croustillance peuvent être observées. Il est intéressant de relier les pertes de qualité organoleptique à l'organisation moléculaire de l'eau dans le produit et à la structure du matériau (microporosité). Au cours d'une étude faite par tomographie de neutrons, les systèmes modèles étudiés et extrudés étaient des mélanges amidon-sucre-eau. Le paramètre étudié était la quantité d'eau présente au cours de l'extrusion, ensuite au cours du stockage. Les porosités de ces produits extrudés sont très différentes et ont été quantifiées par tomographie de neutrons sur la station d'imagerie d'Oak Ridge aux Etats -Unis en collaboration avec Hassina Bilheux et Jean-Christophe Bilheux en charge de cet instrument, avant la mise en place de la station d'imagerie du LLB. Les échantillons avaient été stockés à différentes humidités relatives et les microporosités ont été mesurées ensuite. La figure 27 présente le dispositif expérimental mis en place pour réaliser les tomographies et un exemple d'images obtenues pour deux échantillons de porosités différentes.

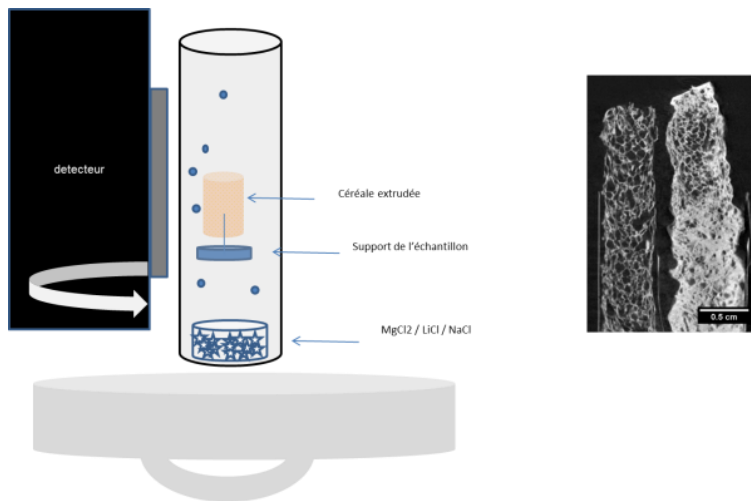


Figure 27: Dispositif expérimental utilisé pour réaliser les expériences de tomographie de neutrons à Oak Ridge et exemple d'images obtenues sur deux produits de porosités différentes.

Après la mesure des images à 180 différents angles de l'échantillon (60 à 120 secondes d'exposition par image, soit 3h ou 6h de mesure par tomographie pour chaque échantillon), nous avons utilisé un logiciel de reconstruction du volume (OCTOPUS à Oak Ridge et au LLB). La figure 28 présente un exemple de reconstruction 3D obtenue pour l'un des échantillons.

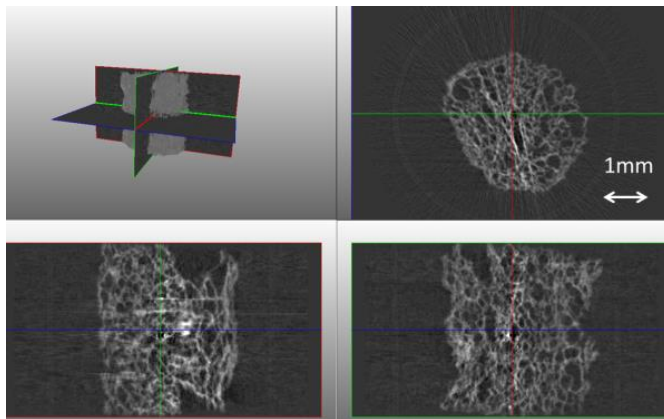


Figure 28: Exemple de reconstruction 3D obtenue sur l'un des échantillons de produits céréaliers extrudés.

A partir des reconstructions 3D et en utilisant d'autres logiciels (AVISO Fire au LLB ou Matlab avec des macros développées par Jean-Christophe Bilheux à Oak Ridge), il est possible d'analyser la porosité des produits et, plus particulièrement, de déterminer le nombre de trous présents dans chacun des produits en fonction de la formulation et des conditions de stockage. Les mêmes logiciels nous permettent aussi de qualifier le squelette des produits. La figure 29 présente des étapes des traitements d'images (dans ce cas le logiciel AVISO au LLB) avec la quantification des trous en 2D et 3D.

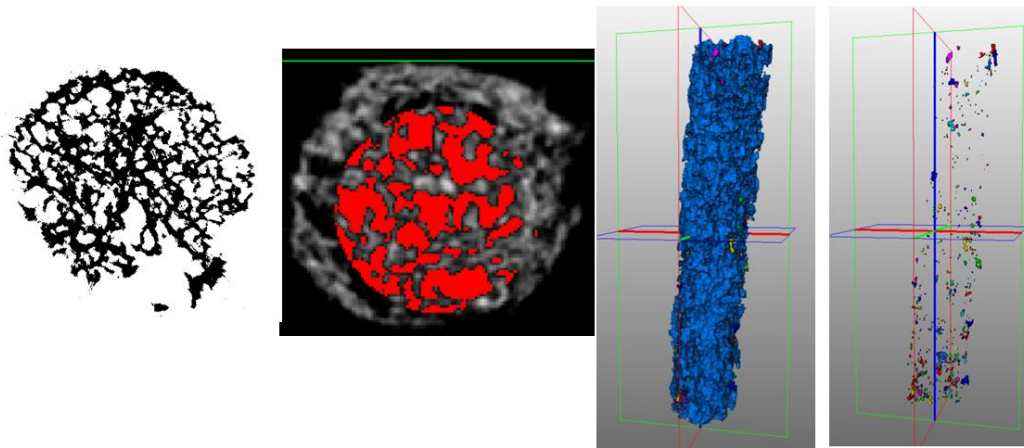


Figure 29: Exemple de quantification des trous pour l'une des coupes du volume, en 2D à gauche et en 3D à droite, en utilisant le logiciel AVISO et son application « Porosities analysis ».

Le tableau 3 présente la quantité de trous déterminés pour deux types d'échantillons de produits céréaliers, extrudés en présence de plus ou moins d'eau (20% et 15%) et stockés ensuite (donc équilibrés) à haute et faible humidité relative (NaCl, 75% d'eau et MgCl<sub>2</sub>, 33% d'eau, respectivement).

Tableau 3: Nombre de trous déterminé par analyse d'images, sur des reconstructions 3D obtenues pour des échantillons de produits céréaliers extrudés, en présence de plus ou moins d'eau et conservés à différentes humidités relatives.

Echantillon	Nombre de trous / volume d'échantillon analysé (466.3 mm <sup>3</sup> )
<b>Extrudé à 15% d'eau/ Stocké à RH 33%</b>	889
<b>Extrudé à 15% d'eau/ Stocké à RH 75%</b>	986
<b>Extrudé à 20% d'eau/ Stocké à RH 33%</b>	1058
<b>Extrudé à 20% d'eau/ Stocké à RH 75 %</b>	1382

Cette analyse nous a permis de montrer que la teneur en eau au cours de l'extrusion avait un effet important sur la porosité, déterminée par la quantité de trous, ainsi que sur l'évolution de cette quantité de trous au cours du stockage.

Aujourd'hui, dans la station d'imagerie du LLB, les reconstructions issues des tomographies et leurs analyses sont totalement opérationnelles. Des mesures plus systématiques et en relation avec d'autres paramètres, comme la teneur en saccharose lors de l'extrusion, sont réalisées au sein de notre équipe, dans le cadre de la thèse de Supuksorn Masavang, dirigée par le professeur Dominique Champion.

### 2.2.3. Bouchons de liège de différentes qualités

Dans le domaine œnologique, de nombreuses études sur l'oxydation des vins blancs suggèrent que les obturateurs en liège, à cause de leur porosité, sont des éléments déterminants de l'état oxydatif du vin [Karbowiak, 2010]. Certains travaux récemment réalisés dans notre laboratoire sur les cinétiques de transfert et de diffusion de molécules, comme l'oxygène, l'eau ou le SO<sub>2</sub>, à travers les bouchons de liège ont montré l'importance de la porosité du matériau sur ces transferts [Lequin, 2010]. Des bouchons de liège de différentes qualités ont ainsi pu être sélectionnés. Dans le cadre de la thèse d'Auréli Lagorce-Tachon dirigée par le Dr. Thomas Karbowiak et le professeur Jean-Pierre Bellat, nous avons réalisé, en parallèle à des mesures de diffusion d'oxygène à travers ces obturateurs de différentes qualités, des mesures d'imagerie neutronique. Ainsi, nous avons visualisé les défauts au



cœur des bouchons (en plus des mesures faites avec des photographies des surfaces, classiquement menées pour qualifier les bouchons), le but étant d'établir une relation éventuelle entre les défauts structuraux ou la porosité des bouchons et les transferts ayant lieu aux interfaces.

Les photographies ont permis de quantifier les défauts présents à la surface des bouchons. Le grade 0 (la meilleure qualité de liège) présente 4,1% de défauts (surface des défauts divisée par la surface du bouchon) tandis que le grade 4 en compte 6,7%. L'imagerie neutronique permet de quantifier non seulement les défauts présents à la surface mais aussi ceux qui se trouvent à l'intérieur du matériau. Cette technique a permis de comptabiliser 5,4% de défauts en volume pour le grade 0 et 6.5% pour le grade 4. La radiographie permet d'obtenir une image en deux dimensions. À partir d'un ensemble d'images 2D, la tomographie permet d'obtenir, par reconstruction, une image en trois dimensions du matériau, donc d'observer la répartition des lenticelles le long du bouchon ainsi que l'absence de connectivité entre elles.

La figure 30 illustre la méthode utilisée pour la quantification des défauts à partir des radiographies de neutrons.

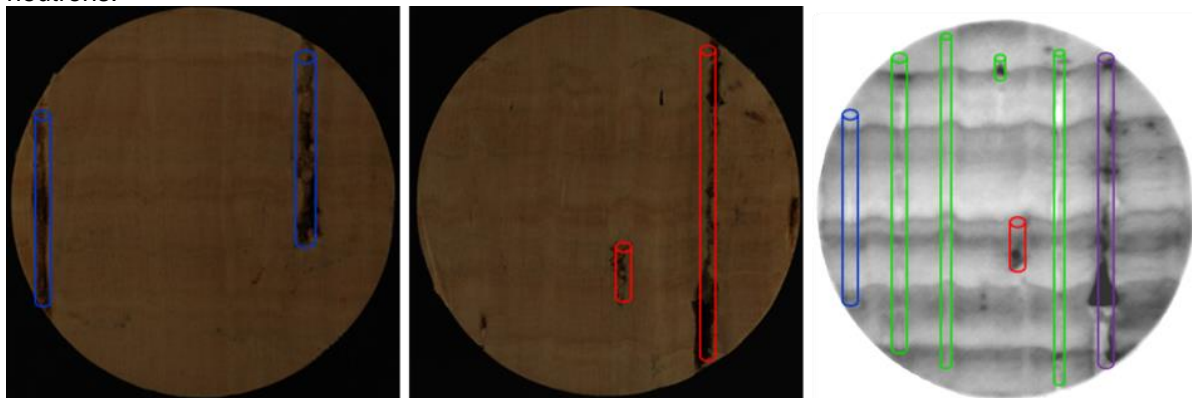


Figure 30: Identification et quantification des défauts à partir des radiographies de neutrons. A gauche : recto; au centre : verso; à droite : imagerie de neutrons de la rondelle de liège.

Y sont représentés le recto et le verso d'une même tranche de liège de 3 mm d'épaisseur. La technique permet de visualiser non seulement les défauts en surface, mais également ceux à l'intérieur du matériau. Dans cette partie de l'étude, les lenticelles sont assimilées à des cylindres. Celles qui sont visibles à la surface de l'échantillon sont représentées par des cylindres bleus pour le recto et rouges pour le verso. Les cylindres représentés en vert indiquent les lenticelles présentes à l'intérieur du matériau, qui ne peuvent être identifiées que grâce à la radiographie de neutrons. Le diamètre et la longueur de chaque cylindre permet d'avoir une estimation du volume de chaque défaut présent dans le volume d'une tranche. Les résultats sont exprimés en pourcentages volumiques de défauts c'est-à-dire, du rapport entre la somme des volumes des lenticelles et le volume total de la tranche de liège.

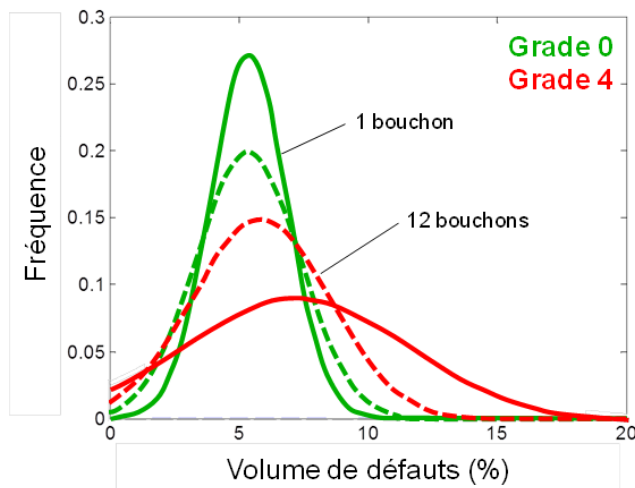


Figure 31: Pourcentages de défauts en volume obtenus à partir de l'analyse de radiographies de neutrons de lièges de grades 0 et 4, en prenant en compte la variabilité intra et inter-individus (échantillonnages issus d'un seul ou de plusieurs bouchons).

La Figure 31 représente le volume occupé par les lenticelles dans des rondelles de liège de 3 mm provenant d'un seul ou de plusieurs bouchons, pour deux qualités différentes. Les bouchons de meilleure qualité (grade 0) contiennent en moyenne 5,4 % de défauts en volume alors que ceux issus du grade 4 en comptent 7,2 et 5,9 % (suivant que la moyenne est calculée sur 1 ou 12 bouchons). Les distributions des défauts provenant d'un seul ou de 12 bouchons sont encore une fois très similaires. Cependant, la comptabilisation des défauts par cette technique ne permet pas de différencier de manière significative les bouchons de bonne ou de moins bonne qualité. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que cette quantification ne constitue qu'une première approche pour l'évaluation du volume occupé par les lenticelles dans le liège. La tomographie, à l'aide d'une reconstruction en 3D du matériau, permet une évaluation plus précise.

Le principe de la tomographie est équivalent à celui de la radiographie : les neutrons traversent le matériau et permettent ainsi de visualiser les défauts présents à l'intérieur du liège. Contrairement à la radiographie où une image en deux dimensions est obtenue à partir d'une tranche de liège de 3 mm, la tomographie permet d'obtenir (après reconstruction des images) une représentation en trois dimensions du bouchon entier (figure 32).

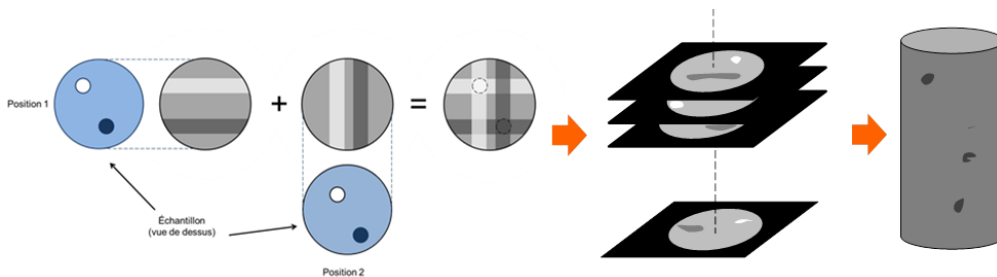


Figure 32: Reconstruction d'une image 3D à partir des données de tomographie.

La visualisation et la quantification des lenticelles ont été réalisées au LLB à l'aide d'un logiciel spécifique d'analyse d'images en volume (AVISO Fire). La figure 33 présente certaines étapes de cette analyse.

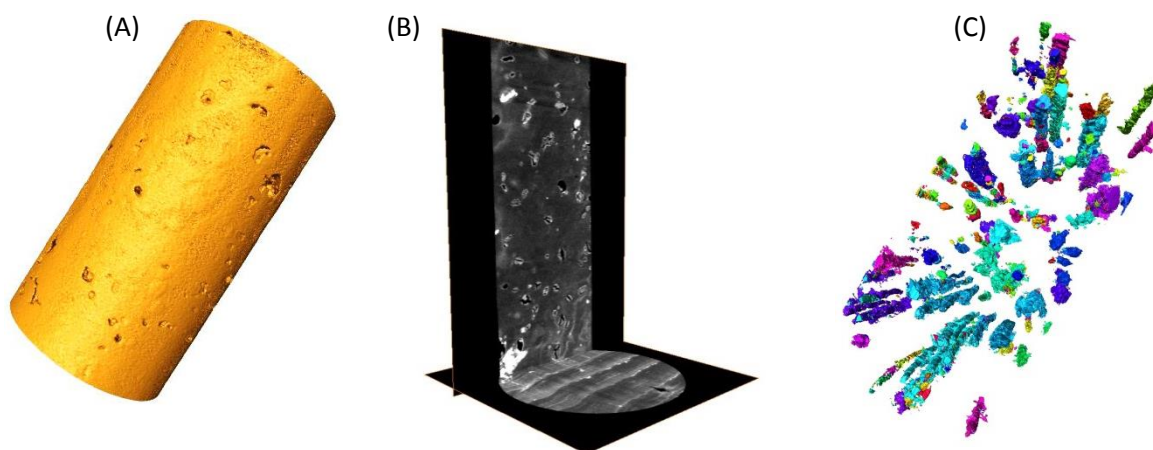


Figure 33 : Tomographie de neutrons d'un bouchon entier grade 0. (A) surface de l'échantillon ; (B) coupes axiale et radiale ; (C) lenticelles.

Cette figure (33) représente un bouchon reconstruit en 3D à partir des données de tomographie. La dernière image (C) permet de visualiser uniquement les lenticelles et montre qu'elles ne sont pas



connectées entre-elles. En conséquence, lors de la diffusion à travers le bouchon, les molécules de gaz (comme l'oxygène) ne peuvent pas traverser le bouchon uniquement par les lenticelles; elles doivent franchir les parois des cellules de liège. La Figure 34 présente le pourcentage de défauts déterminé par les données de tomographie neutronique pour deux qualités de bouchons de liège.

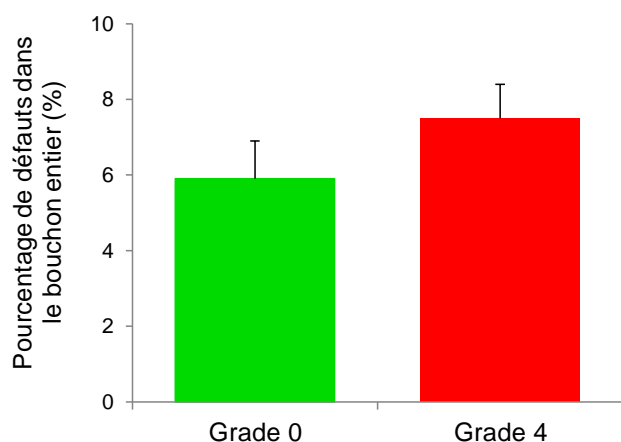


Figure 34: Proportion de défauts présents dans un bouchon entier, déterminée par tomographie neutronique. La moyenne et l'écart type sont calculés à partir de 3 bouchons différents et pour deux qualités de liège).

Les défauts occupent en moyenne 5,9 %  $\pm$  1.0 du volume des bouchons du grade 0 contre 7,5 %  $\pm$  0.9 pour ceux du grade 4. La proportion de lenticelles dans les bouchons de meilleure qualité est donc significativement inférieure à celle des autres bouchons étudiés.

Plus récemment, nous avons étudié les bouchons dans des bouteilles de vins plus ou moins oxydés et provenant d'un même domaine, sur une série d'un même vin mais d'années différentes. De la même façon, nous avons pu montrer, par des analyses d'imagerie et de tomographie de neutrons, qu'il existe une corrélation entre les défauts dans les bouchons et le degré d'oxydation du vin, celui-ci étant quantifié soit par un panel d'œnologues soit par des mesures chimiques ou physicochimiques. Cependant, en réalisant les mesures de tomographie sur les bouchons dans les bouteilles, il apparaît aussi comme très important de prendre en compte l'effet sur le degré d'oxydation dû à l'interface liège-verre de la bouteille. La figure 35 présente des exemples d'images obtenues par imagerie de neutrons sur cette série de vin blanc, et sur l'interface liège-bouteille.

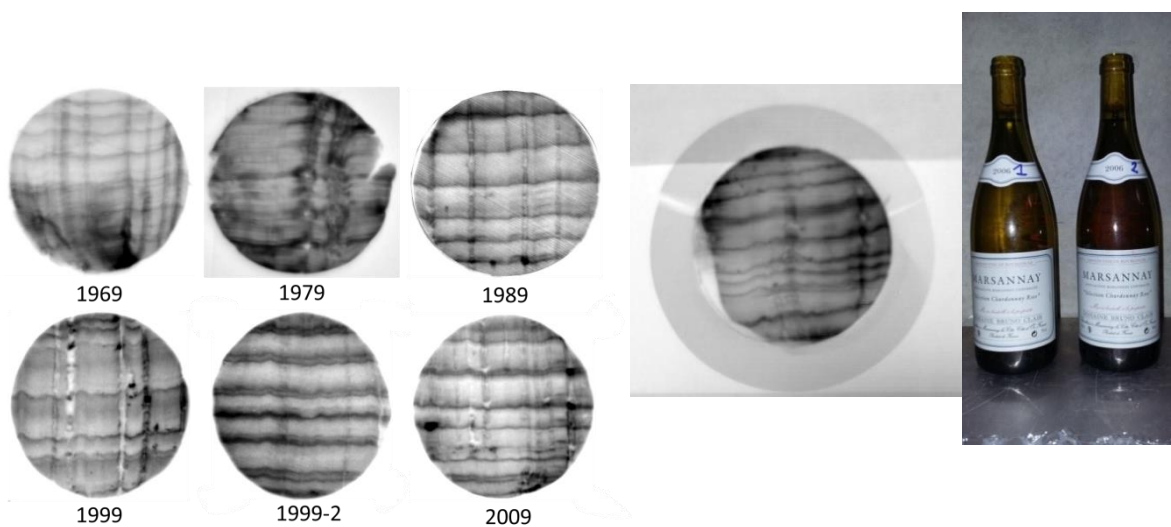


Figure 35: A gauche : Série verticale (même vin sur plusieurs millésimes) de vins d'un même domaine : Images obtenues par imagerie de neutrons. Les vins les plus oxydés sont ceux qui présentent le plus de défauts dans le bouchon comme le vin de 1999, par exemple. Au centre :

exemple d'image obtenue sur un bouchon dans la bouteille. A droite : deux bouteilles de vin étudiées, issues d'un même domaine, d'une même année et de deux vins plus ou moins oxydés.

Aujourd'hui, dans le cadre de sa thèse, Kevin Crouvisier sous la direction de Thomas Karbowski et Jean-Pierre Bellat, étudie la relation entre les propriétés mécaniques des bouchons de Champagne, leurs mises en bouteille et les transferts aux interfaces liège-bouteille. L'attention est aussi focalisée sur les conditions de stockage. Il s'agit d'une thèse CIFRE financée par les producteurs de bouchons et par le Bureau Interprofessionnel des Vins de Champagne. L'imagerie, la tomographie et l'analyse d'images sont des outils importants dans cette nouvelle étude.

#### 2.2.4. Cuisson de la viande

Des mesures d'imagerie de neutrons ont aussi été mises en œuvre dans le cadre du projet « Open Food System », projet d'innovation industriel (piloté par le groupe SEB) qui réunissait 25 partenaires industriels et académiques dont l'un des objectifs était le développement d'appareils électroménagers « intelligents », capables de piloter la cuisson des viandes et des poissons. J'étais en charge d'une partie du programme "Opticook" et plus particulièrement de la partie du projet qui visait à innover sur la technologie des fours, grâce au développement de capteurs spectroscopiques capables de suivre et de piloter la cuisson de viande et poisson sans toucher les matrices. Plusieurs axes de recherche ont été développés dans le cadre de ce programme, qui ont permis d'optimiser la cuisson de viande et de poisson, d'identifier les réactions biochimiques permettant aux capteurs de suivre la cuisson sans intrusion, de développer les capteurs et de les intégrer dans les fours. La thèse de Simone Scussat que j'ai co-encadré (à plus de 80%) s'est inscrite dans ce projet et avait pour objectif de suivre par spectroscopie l'évolution de la cuisson à l'échelle moléculaire, en décrivant les réactions biochimiques qui se produisent au niveau des constituants du muscle et en les associant aux caractéristiques macroscopiques (texture, couleur, ...) qui sont plus classiquement étudiées en science des aliments.

Dans un premier temps, nous avons recherché les signatures spectroscopiques de la dénaturation thermique des différentes protéines de la viande et du poisson (myosine, hémoprotéines et collagène, à l'échelle moléculaire). Les mesures réalisées sur des échantillons de viandes de bœuf, de poulet et de cabillaud dans les domaines du visible et du proche infrarouge, nous ont permis de sonder la structure des hémoprotéines, et plus particulièrement d'observer les changements d'état d'oxydation de l'atome de fer et de ligands au niveau de l'hème, selon le degré de cuisson ou pendant la cuisson. Ces observations à l'échelle moléculaire sont mises en rapport, à l'échelle macroscopique, avec des changements de couleur mesurés soit par colorimétrie soit par un panel d'experts en évaluation sensorielle. D'autre part, en utilisant les spectroscopies de moyen infrarouge ou de fluorescence du tryptophane, il est possible de distinguer différents degrés de cuisson des mêmes échantillons. Grâce aux spectroscopies, ce sont les changements des structures secondaires des protéines que nous pouvons observer suite à l'application de différents barèmes de température.

Au niveau macroscopique, à différents degrés de cuisson correspondent des textures différentes. Les changements de structure que subissent les protéines à certaines températures bien définies sont naturellement associés à des changements de structure aux échelles microscopique et macroscopique et qui sont dus à des interactions ou des agrégations. Des phénomènes de gélification des fibres, de séparation de phase ou de migration de jus sont observés à l'échelle macroscopique. A l'échelle microscopique, nous avons étudié l'effet des barèmes de cuisson sur la contraction des myofibrilles qui provoquent la libération du jus. Pour cela, nous avons réalisé des mesures sur des échantillons de viande de bœuf cuits à plusieurs degrés de cuisson, en utilisant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à bas champ et la tomographie de neutrons. La figure 36 présente les résultats obtenus par RMN bas champ sur 4 échantillons, en utilisant différentes séquences qui permettent de quantifier soit les protons les plus mobiles (CPMG), donc du jus, soit les moins mobiles (échos de Hahn et Solide), donc ceux de la matrice.

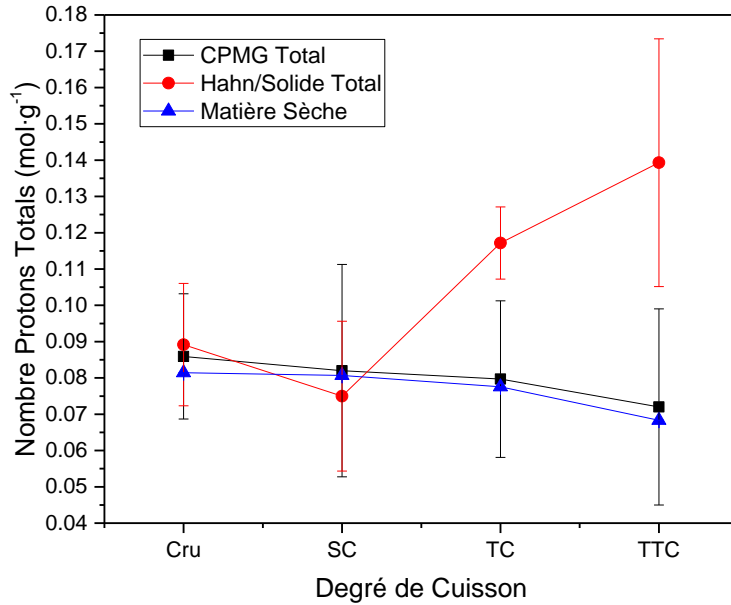


Figure 36: Nombre de protons des séquences RMN de CPMG (noir), des échos de Hahn et de Solide (ensemble, rouge) et issu de la matière sèche (bleu) en fonction du degré de cuisson de la viande de bœuf (SC pour sous cuit, TC pour trop cuit, TTC pour trop trop cuit).

La figure montre que le nombre de protons évalué par la séquence CPMG et par matière sèche est similaire et qu'il diminue lorsque l'on augmente le degré de cuisson. Cela peut être mis en relation avec la perte en eau qui résulte de la cuisson. Le nombre de protons évalué à l'aide de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide augmente avec la température. Une expérience, complémentaire à ces mesures de temps de relaxation, est la mesure des coefficients de diffusion des protons en utilisant la RMN à gradient de champ pulsé. La figure 37 présente l'évolution du coefficient de diffusion en fonction du degré de cuisson pour les mêmes échantillons de viande.

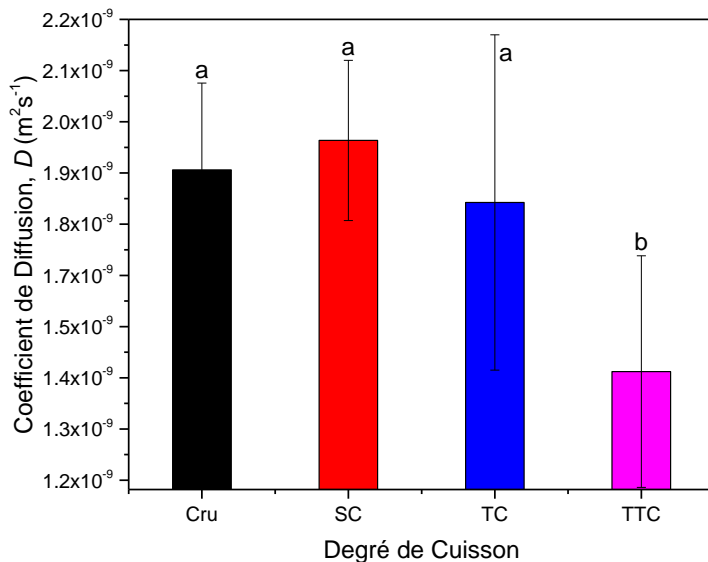


Figure 37: Evolution du coefficient de diffusion,  $D$  ( $m^2.s^{-1}$ ), en fonction du degré de cuisson d'échantillons de viande de bœuf. Les lettres indiquent l'appartenance de chaque échantillon aux groupes a ou b, d'après l'ANOVA et le test de comparaison des moyennes de Tukey ( $\alpha = 0.05$  ; taille de l'échantillon : trois répétitions). Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance.

Le coefficient de diffusion de l'échantillon Sous Cuit (45 °C) est plus grand que celui de l'échantillon Cru, ce qui peut être dû à la dénaturation du filament de myosine. La moindre diffusion dans les deux

autres échantillons, Trop Cuit (68 °C) et Trop Trop Cuit (90 °C), est à imputer à la réduction de teneur en eau (2,5 et 12 %) et à la réorganisation de la microstructure fibrillaire et extracellulaire qui a lieu à haute température. Pour approfondir ces résultats de RMN, nous avons réalisé des expériences de tomographie de neutrons, afin d’observer la contraction des fibres de l’échantillon de viande, donc d’observer la formation de zones plus ou moins denses en fibres en fonction du degré de cuisson et, d’étudier l’évolution de la morphologie. Dans les expériences de tomographie, nous nous sommes servis du logiciel d’analyse d’images 3D AVISO Fire et du module “Porosities Analysis Wizard” pour caractériser précisément les changements de morphologie des échantillons, lesquels sont d’autant plus nets que l’on augmente la température de cuisson et, donc, les défauts des échantillons de viande. Comme nous l’avons vu, ce logiciel permet de quantifier le volume occupé par les défauts dans les échantillons et de les classer selon leur taille à partir des reconstructions 3D. La figure 38 présente les reconstructions 3D obtenues sur les différents échantillons de viande dans la station d’imagerie IMAGINE du LLB, ainsi que l’analyse des images.

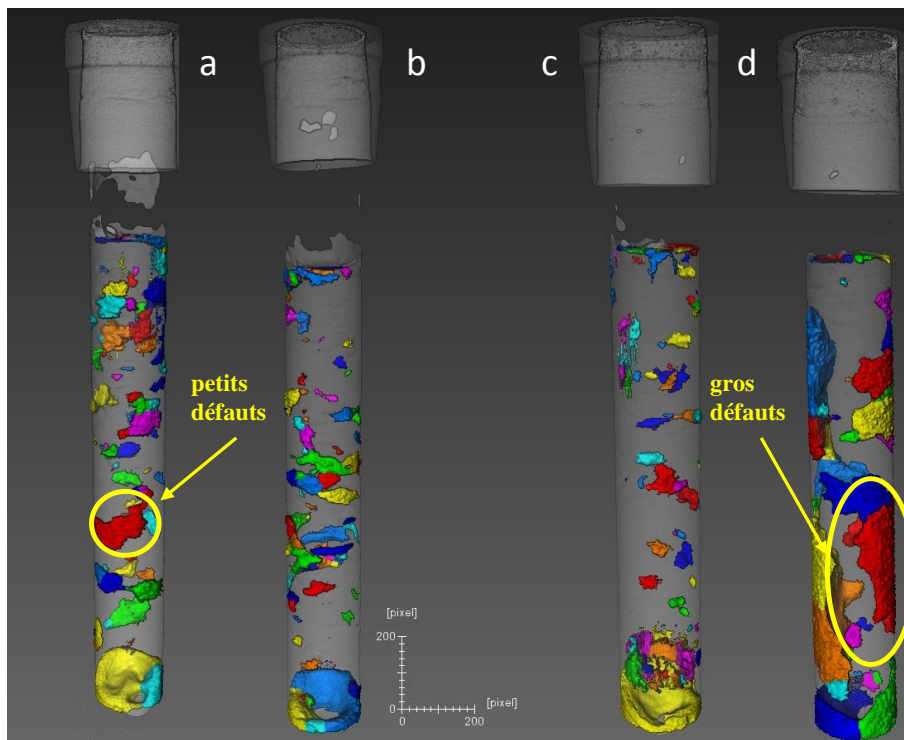


Figure 38: Échantillons de viande reconstitués en 3D (a: Cru; b: Sous Cuit; c: Trop Cuit; d: Trop Trop Cuit). Les images visualisent, en couleur, des défauts présents dans les échantillons, grâce à l’analyse d’images 3D réalisée avec le logiciel AVISO.

Les résultats de la tomographie de neutrons, incluant l’analyse des images 3D, qui permet de quantifier les défauts dans les échantillons et le changement de morphologie, confirme l’interprétation des résultats obtenus par RMN. Des modifications importantes sont visibles sur l’échantillon Trop Trop Cuit donc au-dessus de 68 °C. Dans un premier temps on peut observer la réduction du diamètre des myofibrilles (45-63 °C), puis la réduction de leur longueur (55-65 °C) [Bendall et Restall, 1983].

La dernière partie de la thèse de Simone Scussat a eu pour objectif de coupler les deux approches, moléculaire et macroscopique, en effectuant des mesures d’imagerie de neutrons pendant la cuisson dans le four équipé de capteurs prototypes (fibre optique). Le couplage a donc été réalisé en utilisant trois “acteurs” pendant la cuisson :

- le four du programme Opticook, un four semi professionnel modifié (avec des hublots), utilisé pour pouvoir faire des mesures spectroscopiques et d’imagerie de neutrons pendant les cuissons;
- l’imagerie de neutrons, qui nous a permis de suivre les changements de morphologie, la contraction des fibres et la migration du jus;
- la spectroscopie, qui donne des informations sur le degré de cuisson en sondant la structure des protéines qui constituent la viande.

La figure 39 présente les principaux résultats du couplage de la spectroscopie et de l'imagerie de neutrons. Il s'agit d'images neutroniques et de spectres dans le visible, obtenus pendant la cuisson.

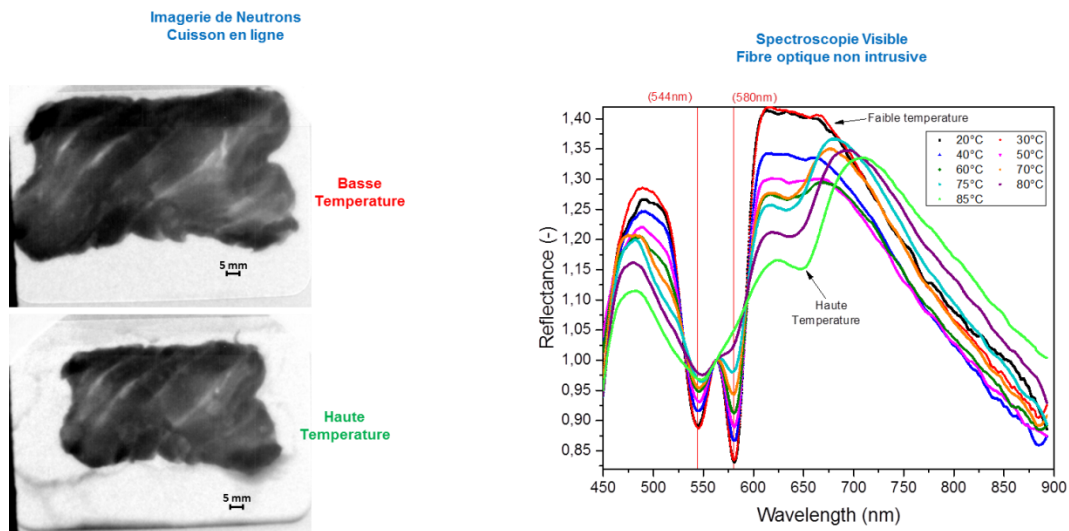


Figure 39: Mesures simultanées d'imagerie de neutrons (à gauche) et de spectroscopie dans le visible à l'aide d'une fibre optique (à droite) d'une tranche de bœuf lors de sa cuisson dans le four OPTICOOK sur la station d'imagerie IMAGINE du LLB.

L'évolution du ratio (hémoprotéines met et oxy - 544/580 nm) en fonction du temps (et donc de la température) met en évidence des événements caractéristiques (le spectre du visible présentant les pics des oxy et met hémoprotéines, et les images des niveaux d'intensité de neutrons) à trois températures clé : 20, 50 et 87 °C. Grâce à ces mesures couplées (aussi réalisées en fluorescence), nous avons pu montrer que les capteurs de surface rendaient bien compte des évolutions de la cuisson (dans son ensemble, et donc à cœur) de la viande et du poisson. Les capteurs ont été développés pour être intégrés dans les fours.

Le potentiel du couplage entre, d'une part, l'imagerie de neutrons, qui permet de réaliser des mesures à travers ou dans des environnements encombrés (ici un four), et, d'autre part, plusieurs spectroscopies (ici visible et fluorescence) fait aujourd'hui l'objet d'un post doctorat dans le cadre d'un projet d'instrumentation piloté par Jean-Marc Zanotti (SINE 2020) au Laboratoire Léon Brillouin. Il s'agit d'une étude sur l'hydratation de produits céréaliers extrudés, qui permettra aussi de développer le couplage entre la RMN bas champ et l'imagerie de neutrons.

### 3. Projet de Recherche

Je souhaite poursuivre mes activités de recherche sur la structure des protéines en milieu complexe pour mieux comprendre l'impact de stress tels que les hautes pressions, le séchage, ou le confinement dans des matériaux poreux sur ces protéines et travailler à la mise en place d'outils d'étude et de caractérisation de ces changements de structure et de dynamique protéique. Aussi, comme mentionné dans le bilan de mes activités, certains travaux encore en cours font l'objet de post doctorats ou de projets auxquels je suis toujours associée.

Par exemple, en ce qui concerne l'étude des protéines sous pression, je poursuis le travail sur l'impact des ligands sur la résistance à la pression de la beta-lactoglobuline ou des hémoprotéines. Ces études sont essentiellement menées par diffusion de neutrons et font donc partie de ma collaboration avec le Laboratoire Léon Brillouin. Plusieurs articles sont en cours de rédaction. Ma collègue, Sophie Combet (chercheuse CNRS au LLB) envisage de déposer un projet ANR sur la compréhension de l'effet de la pression sur les protéines en présence de ligands, avec comme partenaire l'équipe de Christian Roumestand à Montpellier (centre de biologie structurale). Nous voulons étendre nos

mesures de la structure des protéines sous pression à la RMN. La contribution de notre équipe dijonnaise concerne surtout le choix des protéines modèles, leurs biochimie et interactions avec des ligands, que nous faisons en tenant compte des problématiques agroalimentaires. Dans la continuité des travaux déjà menés, nous proposons d'étudier les hémoprotéines contenues dans la viande et les produits carnés, produits qui sont de plus en plus traités à hautes pressions, et dont les changements de couleur sous pression ne sont pas encore complètement maîtrisés, encore plus dans le cas des produits sans nitrites ! Les protéines du lactosérum, avec la beta-lactoglobuline, et sa dénaturation exacerbée par la pression, sont aussi des objets d'étude d'actualité en agroalimentaire. En effet, ce procédé est utilisé (de façon assez empirique) pour augmenter le rendement fromager. Nous allons sans doute ajouter à ces objets d'étude, une protéine extraite de microalgues (notamment de la spiruline), la C-phycoyanine, protéine utilisée comme colorant naturel (couleur bleue) dans de nombreuses boissons, qui sont traitées par pression et qui présentent des évolutions négatives de stabilité de la couleur suite à ce traitement.

Un autre projet, toujours d'actualité mais que je n'ai pas développé dans mon bilan d'activité, concerne les interactions protéines-polyosides. Je travaille sur ce sujet depuis plusieurs années avec mon collègue Ali Assifaoui, physicochimiste, spécialiste des pectines, soit depuis que, dans le cadre du master recherche de Sonia Lequin (2006) sur le séchage des émulsions, j'étudiais les interfaces protéines-lipides. Nous avons montré que la présence de pectine lors du séchage d'une émulsion stabilisée par de la beta-lactoglobuline, évitait l'agglomération des lipides et permettait d'obtenir à nouveau une émulsion stable après le séchage. Ensuite, nous avons été sollicités par Nestlé (PTC de Konolfingen) pour travailler sur les interactions protéines –polyosides en présence de minéraux, et nous avons encadré plusieurs stages de master, dont celui d'Aline Maire du Poset, qui a poursuivi en thèse. Elle travaille aujourd'hui sur des hydrogels à base de fer, sous la direction d'Ali Assifaoui et de Fabrice Cousin (un collègue du LLB). Le financement de sa thèse est du type Région (Dijon)- LLB-Soleil. L'étude des mélanges protéines-polyosides en dessous de la zone d'incompatibilité (domaine co-soluble) trouve son application dans plusieurs produits alimentaires tels que les émulsions et les boissons lactées. Dans le cas des émulsions, la protéine joue le rôle d'agent tensio-actif. Elle stabilise le système en s'absorbant à l'interface entre la phase lipophile et la phase aqueuse. Les polyosides, qui sont utilisés comme agents de texture, peuvent contribuer à la stabilité du système. Afin de comprendre les interactions mises en jeu entre ces deux macromolécules en présence de minéraux, une approche allant du système complexe au système simplifié a été élaborée. Ainsi, un mélange industriel complexe composé d'un isolat de protéines de lactosérum (WPI) et d'une pectine (LMP) a été étudié en présence de minéraux solubles et insolubles. Pour aider la compréhension, ces isolats de protéine ont été remplacés par une protéine modèle purifiée dans notre laboratoire (la betalactoglobuline, BLG). La pectine aussi a été remplacée par l'acide polygalacturonique (polyGal). Au terme de cette étude, qui portait sur la fixation des minéraux insolubles sans gélification dans une boisson riche en protéines de lait, plusieurs voies ont été proposées pour répondre à la problématique industrielle :

- modifier l'ordre d'incorporation des ingrédients
- maintenir le pH à une valeur supérieure à 6,5.

Pour mieux comprendre ces phénomènes, il a été suggéré à l'industriel d'étudier plus finement (i) les interactions entre la protéine majoritaire du lactosérum et la pectine, (ii) la structure de la protéine (iii) la structure des macromolécules du mélange (iv) l'impact de l'ajout d'un cation divalent ( $Ca^{2+}$ ) sur les interactions. Nous continuons ce projet sur le système modèle, en collaboration avec le Professeur Anette LARSSON, directrice du centre « Supermolecular Biomaterials-structure, dynamics and properties » (SuMo), et le Dr. Anna Strom. En effet, dans le cadre de la collaboration franco-suédoise associée au projet imagerie, nous avons été en contact en décembre 2016, avec ces collègues de l'Université de Chalmers pour travailler sur les hydrogels à base de protéines et de pectines. Puis, en 2017, j'ai été invitée à plusieurs reprises à Göteborg pour présenter mes travaux et faire un cours sur l'imagerie et la diffusion de neutrons permettant d'étudier ce type d'assemblage. Les collègues suédoises sont venues au LLB en juin 2017 pour réaliser des expériences de diffusion de neutrons et sur cette base nous avons déposé un sujet de post doctorat à l'appel à projets de 2017, du « Nordic Neutron Science Program ». Le Dr. Mikaela Borjesson a obtenu ce financement et va donc débiter son post-doctorat entre Chalmers, notre laboratoire à Dijon et le LLB en mai 2018, pour un an. Elle travaillera sur les interactions BLG-PGA et calcium. Un stage de master recherche financé par l'UMR PAM, dans l'axe stratégique, est aussi en cours sur ce sujet (Pierre Fouilloux). Le post-doctorat et le stage de master sont intimement liés, et, en partie, portent tous deux sur l'impact de la pré-dénaturation de la protéine sur l'interaction avec le polyoside et les minéraux. Pour compléter cette collaboration avec l'équipe de Chalmers, Ali Assifaoui a déposé en octobre 2017 un dossier auprès de

la fondation Weener-Gren pour financer son projet de CRCT (congé pour recherche ou conversion thématique) de 6 mois (mars 2018 – septembre 2018). Il a obtenu ce financement et va travailler à Chalmers sur la caractérisation multi échelles d'hydrogels à base de mélanges de protéines et de polysides. A terme, l'objectif est de structurer un groupe de recherche plus large et de postuler à des financements européens.

En plus de ces activités de recherche que je tiens à poursuivre, le cœur du projet que je voudrais développer dans les prochaines années se divise en deux parties, en relation avec les thèmes émergents de l'équipe de recherche PAV au sein de l'UMR PAM :

- les interactions entre les matériaux organiques et les matériaux inorganiques
- les nouvelles sources de protéines.

Ces deux axes de recherche que je souhaite aujourd'hui développer correspondent à deux défis sociétaux retrouvés dans de nombreux appels à projets. D'une part, l'adsorption ou le confinement des protéines sur des nanoparticules ou des mésoporeux inorganiques sont des problématiques que l'on retrouve aussi bien dans les domaines de la médecine et de la pharmacie que dans les sciences des matériaux ou de l'agro-environnement. D'autre part, le resourcement protéique et la recherche de nouvelles protéines (protéines non conventionnelles) se rapportent à l'un des défis majeur de l'alimentation du futur, compte tenu de l'augmentation de la population mondiale.

### *3.1. Interactions entre les matériaux organiques et inorganiques*

La première partie de mon projet porte sur l'interaction des protéines avec les matériaux inorganiques (argiles, silices, mésoporeux). L'importance des recherches dans le domaine de l'adsorption des protéines sur des surfaces solides résulte des nombreuses applications technologiques et médicales de ce phénomène : séparation chromatographique des protéines, réaction immunologique sur des supports solides, biocapteurs, enzymes immobilisées, biologie des sols (interaction d'enzymes et d'argiles pour la dégradation de la matière azotée des sols), collage du vin, clarification du vinaigre. L'adsorption des protéines sur des surfaces solides est donc un phénomène ayant un impact important en biologie. Nous avons déjà travaillé sur ces problématiques ces dernières années dans le cadre d'un projet financé par la région Bourgogne, qui portait sur l'oxydation des vins blancs, projet porté et animé par notre collègue Régis Gougeon, professeur à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin. Nous avons ainsi réalisé des travaux sur les interactions entre des argiles (bentonites) utilisées pour le collage des vins blancs (ou la clarification des vins) et les protéines (notre modèle de la  $\beta$ -lactoglobuline). Nous avons pu montrer [Assifaoui, 2014] que la présence de protéines globulaires exfoliait les argiles. Cette exfoliation peut augmenter la surface spécifique des argiles et conduire à une plus grande adsorption des polyphénols (resveratrol et tyrosol dans notre étude) présents dans le vin modèle par ces argiles ou par les protéines. Par conséquent à la suite de cette étape de collage, le vin ne présente plus de trouble (la clarification a été bien menée); par contre, il contient moins de polyphénols pour le protéger contre l'oxydation.

Pour continuer sur cette thématique et augmenter le champ des applications possibles, je souhaite étudier la structuration de protéines modèles en milieu confiné (argiles ou mésoporeux fonctionnalisés comme systèmes de confinement). Je propose dans un premier temps d'en choisir deux : 1) la caséine  $\beta$  comme modèle de protéine « linéaire » non organisée et 2) la  $\beta$ -lactoglobuline comme modèle de protéine globulaire, très compacte et organisée. Le premier objectif de l'étude sera d'adsorber ces protéines à la surface de nanoparticules de silice et/ou de les confiner à l'intérieur d'argiles synthétiques ou de matériaux mésoporeux de porosité contrôlée. Ensuite, la structure des protéines en interaction avec le matériau poreux sera observée avec les outils biophysiques que j'ai à ma disposition (calorimétrie, infrarouge, neutrons, RMN) et je réaliserai une comparaison des effets relatifs au confinement sur les structures initiales de la protéine la moins organisée (la caséine) et de la plus organisée (la  $\beta$ -lactoglobuline). Leur aptitude à interagir avec le matériau poreux à la surface ou à l'intérieur des pores, en fonction des caractéristiques des argiles (densité de charge, espaces interfoliaires, porosité...) ou des mésoporeux sera aussi un axe de recherche privilégié. Une étape importante de la compréhension de l'adsorption des protéines sur des surfaces solides et du contrôle de leur fonctionnalité à l'état adsorbé est, encore une fois, la détermination des changements structuraux et dynamiques de la protéine induits par l'adsorption [Devineau, 2013]. J'ai déjà commencé à travailler sur ces aspects dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de radiolyse du CEA de Saclay, lors de la thèse de Stéphanie Devineau dirigée par les Dr. Serge Pin et Jean-Philippe Renault.



### 3.2. Nouvelles sources de protéines

La deuxième partie de mon projet concerne l'extraction et la caractérisation de protéines non conventionnelles, c'est-à-dire de protéines issues de nouvelles matières premières agricoles (algues, insectes, végétaux...). Le contexte planétaire actuel est marqué par une dégradation de l'environnement, une augmentation de la densité des populations et une raréfaction des surfaces de production agricole et des ressources naturelles. Cet état persistant a conduit les pouvoirs publics et un certain nombre d'entrepreneurs à rechercher de nouvelles ressources naturelles ayant un intérêt à la fois nutritionnel et énergétique. Malgré le vif intérêt pour les insectes et les microalgues, deux ressources naturelles riches en protéines et dont le rendement de production est élevé, il reste des verrous scientifiques et technologiques à lever pour envisager la création de nouveaux produits et ingrédients, à l'échelle industrielle, économiquement compétitive et durable. Parmi ces verrous, nous pouvons citer le coût, aussi bien énergétique qu'environnemental, des procédés d'extraction qui s'appuient généralement sur l'utilisation de solvants. En effet, la plupart des procédés conventionnels d'extraction de protéines à intérêt agroalimentaire sont coûteux, dénaturants, et pas toujours compatibles avec les contraintes alimentaires et de durabilité. En plus, actuellement, il n'existe pas, à notre connaissance, de données dans la littérature qui établissent une corrélation entre la qualité des protéines d'insectes et de microalgues et les procédés adoptés et a fortiori aucune étude ne s'est attachée à leurs propriétés fonctionnelles. C'est dans ce cadre, que je travaille aujourd'hui avec Samir Mezdour, ingénieur de recherche à AgroParis Tech (UMR GENIAL) en charge de l'ANR DESIRABLE sur l'impact des procédés d'extraction sur la structure et la fonctionnalité de protéines d'insectes. Les objectifs sont : (1) la préparation d'isolats de protéines (> 80%) d'insectes (ver de farine et mouche soldat) en faisant appel aux procédés classiques d'extraction et de fractionnement basés sur le pressage mécanique des larves d'insectes, la solubilisation dans des solutions aqueuses des protéines et le séchage par étuvage des farines (2) l'étude des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des isolats obtenus en lien avec les traitements appliqués (3) le fractionnement des mélanges protéiques et l'analyse de la structure des protéines. AgroParis Tech et l'UTC de Compiègne sont en charge des deux premières tâches, tandis que l'équipe PCAV se charge de la tâche 3. Dans le cadre du projet ALIM+ financé par la région Bourgogne, nous menons une étude similaire sur les microalgues avec la société Microphyt située à Baillargues (à côté de Montpellier) qui développe des bioréacteurs pour produire ces microalgues et qui souhaite valoriser les peptides et les protéines de ces matières premières. Dans le cadre de la mesure 47 du programme FEAMP, Microphyt vient de proposer un partenariat avec plusieurs organismes académiques (CEA, Ecole des Mines de Montpellier, et AgroSup Dijon) pour un projet innovant (projet REGINA) permettant à Microphyt et aux acteurs de la filière des algues et des microalgues de progresser dans le domaine environnemental. Dans les différents axes retenus sur ce projet, l'un d'eux (dont l'équipe PCAV est en charge) porte sur la valorisation des co-produits (protéiques) issus de l'extraction des composés majeurs ayant un intérêt agroalimentaire (pigments, polysaccharides et lipides).



### III. Activités d'Enseignement

Je souhaitais aussi montrer dans ce document comment, dans mon activité d'enseignement tant au niveau de la formation d'Ingénieurs que dans les formations de Master, j'ai le souci d'appliquer la démarche de chercheuse avec la formation par la recherche. Aujourd'hui, au niveau de l'équipe pédagogique, nous intervenons tous en cours magistraux, travaux dirigés et travaux pratiques. De plus, dans la formation d'ingénieurs, il existe plusieurs phases d'apprentissage sur projets (projet bibliographique de première et deuxième année, projet préindustriel de formulation de troisième année) ou stages (recherche à l'étranger de 6 mois en deuxième année notamment), qui me permettent de mettre en œuvre la « formation par la recherche ». Comme le montre le récapitulatif de ma charge d'enseignement, j'ai une charge de service bien plus importante (en moyenne 275 h) que la charge classique (192 h), à cause de ma participation à toutes ces activités : CM, TD TP et encadrements de projets et de stages. De plus, même si 2/3 de mon service se fait devant des ingénieurs, 1/3 se déroule devant des étudiants de master ou de licence. Je vais rapidement expliquer dans les parties qui suivent, cette spécificité et les stratégies de l'établissement (ENSBANA puis AgroSup Dijon) qui m'ont poussée et me poussent encore à accepter cette surcharge de service d'enseignement.

*Récapitulatif de la charge d'enseignement depuis mon recrutement :*

*2003-2004 : 196 h dont : 2/3 en TP (0,5 eqTD)*

*2004-2005 : 260 h dont : 2/3 en TP (0,5 eqTD)*

*2005-2006 : 280 h dont : 2/3 en TP (0,5 eqTD)*

*2006-2007 : 259 h eqTD dont : 2/3 en TP (0,5 eqTD)*

*2007-2008 : 281 h eqTD dont : 2/3 en TP*

*2008-2009 : 253 h eqTD dont : 2/3 en TP*

*2009-2010 : 330 h eqTD*

*2010-2011 : 350 h eqTD*

*2011-2012 : 320 h eqTD*

*2012-2013 : 120 h eqTD (1/2 délégation CNRS)*

*2013-2014 : décharge totale (1/2 délégation CNRS et décharge d'AgroSup Dijon)*

*2014-2015 : 270 h eqTD*

*2015-2016 : 222 h eqTD*

*2016-2017 : 289 h eqTD*

*2017-2018 : 249 h eqTD*

#### 1. La formation d'ingénieurs

*J'appartiens au Département « Sciences des Aliments et Nutrition » (DSAN) et à l'Unité Pédagogique « Chimie, Physico-Chimie et Formulation » (CPCF). Mes enseignements se font essentiellement en première année, mais aussi en troisième année dans la dominante « formulation et qualité des aliments » aujourd'hui dominante SUFFICIENT «SUStainable Food Formulation: Innovation, Choice of Ingredients; Energy, Nutrition Trade challenges ».*

Lors de mon arrivée à l'ENSBANA, Philippe Cayot en charge du module de chimie alimentaire m'a demandé d'assurer les cours magistraux et les TD qui correspondaient aux protéines. Il s'agissait d'enseignements réalisés en première année, avec 6 h de cours magistraux et 4 h de TD, et de nombreux TP. En effet, une grande partie des travaux pratiques (TP) de ce module, sont relatifs à la biochimie des protéines, avec un TP sur la cuisson de la viande, un sur la gélification du lait et un sur la fabrication du pain. Dans tous les cas, il s'agit d'observer l'impact des procédés sur les fractions protéiques de ces matrices alimentaires en utilisant des dosages chimiques faciles à mettre en œuvre. Même si les outils d'observation se veulent simples (car tous les ingénieurs n'évolueront pas dans des entreprises qui auront de grands moyens ou des services R&D), ces enseignements sont très proches de mes activités de recherche, ce qui me permet de discuter avec les élèves ingénieurs des résultats de ma recherche.

D'autre part, dès mon arrivée dans cette équipe pédagogique, l'une de mes missions était d'intervenir sur des modules transversaux entre la chimie et la physicochimie, notamment les TP Pain et Lait. Il manquait un lien avec la chimie analytique et ainsi, lorsque Daniel Mesnier, notre collègue qui assurait cet enseignement, est parti à la retraite, il m'a été demandé d'assurer la rénovation de l'enseignement

et établir ce lien. J'ai réorganisé le module, avec une entrée en matière axée sur une introduction à la sécurité et aux bonnes pratiques de laboratoire (TP), puis autour de l'analyse de constituants principaux des aliments (TP) pour finir sur une introduction aux principes des outils d'analyse (CM et TD). En ce qui concerne l'analyse des constituants, il existait déjà une partie sur l'analyse des minéraux dans les eaux par spectroscopie d'absorption atomique qui a été conservée mais qui a été incrémentée par un dosage chimique « de paillasse », facile à mettre en œuvre. J'ai créé une partie sur l'analyse des protéines centrée sur les protéines du lait : de la fraction totale à la fraction soluble. J'ai introduit une partie sur les vitamines liposolubles (vitamine E des huiles et graines) et hydrosolubles (vitamine C dans les jus et fruits frais), qui permet de présenter tous les outils de la chromatographie, CPG et HPLC. Pour finir, j'ai remis à jour une partie sur le dosage des sucres dans les fruits et dans la betterave. En complément de ces TP, j'ai créé des cours et TD sur les outils d'analyse : chromatographies, spectroscopies, électrophorèse-dialyse-diffusion de la lumière. Ainsi après cette entrée en matière dans la chimie des aliments par l'analyse, sur des matrices relativement simples, eau, lait, jus, les élèves ingénieurs appréhendent ensuite les réactions chimiques et l'impact des procédés de transformation sur cette chimie, dans le module de Philippe Cayot sur des matrices plus complexes. Ils voient alors la limite de la mise en œuvre de certains dosages ou outils sur de telles matrices complexes. A la fin de cet enseignement de chimie, nous proposons aux étudiants un TP libre, pendant lequel le groupe (de 16 à 25 étudiants) doit monter une journée de TP sur un sujet que nous donnons plusieurs semaines avant, au cours d'un TD. Il s'agit de répondre à une question de chimie par la mise en place d'expériences autour de thèmes tels que : Quels sont les polyphénols du chocolat? Sont-ils présents dans le chocolat blanc et dans le chocolat noir? Quel est l'impact des procédés sur l'activité antioxydante du café? Quel est le degré d'avancement de la réaction de Maillard dans des poudres de lait stockées dans différentes conditions de température et d'humidité relative? Etudier l'impact des procédés de séchage de la spiruline sur ses constituants majoritaires et minoritaires....

La formation par la recherche dont je parlais dans l'introduction se retrouve dans toutes ces phases d'apprentissage, et notamment les TP, de la chimie analytique au TP libre de chimie. Pour tous les TP (sauf pour le TP libre), nous distribuons aux élèves un polycopié qui inclut des protocoles mais avec une possibilité de mettre en œuvre beaucoup plus d'expériences qu'ils ne peuvent en faire dans une journée. De plus, ils entrent dans une salle vide. Ils ont ainsi à organiser la salle, le groupe, la journée, donc à choisir de répondre à une question pour raconter une histoire... Bref, ils mettent en place l'ensemble de la démarche, avec le support de notre polycopié. Cet exercice de mise en place du protocole expérimental pour répondre à une question de recherche (en groupe) est accentué dans le dernier TP, le TP libre, pour lequel les élèves ne disposent pas de polycopié mais ont accès à une base d'articles scientifiques (ils doivent d'ailleurs en trouver d'autres) sur lesquels nous les faisons travailler pour établir les protocoles en TD et aboutir à la séance du TP unique.

Nous réutilisons cette pédagogie sur projet en troisième année, dans le module optionnel sur les nouvelles sources de protéines. Ce module dure une semaine. Chaque année, nous travaillons avec un partenaire extérieur sur une question d'actualité associée à la thématique du resourcement protéique. Parmi d'autres, les questions abordées ont été :

- Les protéines de farine de *Tenebrio Molitor* (ver de farine) peuvent-elles être incorporées telles quelles sans désaromatisation dans un aliment? (Partenaire industriel : les fruits de terre, Lyon) ;
- Comment valoriser des tourteaux de chanvre riches en protéines? (Partenaire industriel : La Goutte d'or du plateau, Poligny) ;
- Quel est l'impact du procédé d'extraction (ultrasons, solvants...) sur les protéines de microalgues? (Partenaire industriel : Microphyt, Montpellier).

Deux autres phases d'enseignement dans la formation des élèves ingénieurs m'ont souvent amené à solliciter la démarche du chercheur. Tout d'abord, l'encadrement de leur stage de deuxième année, dans un laboratoire de recherche à l'étranger, qui a lieu d'avril à septembre. Certains élèves ingénieurs de deuxième année ont même réalisé ces stages dans des laboratoires de mes proches collaborateurs de recherche, et sont donc co-auteurs de mes articles. Puis, le projet tutoré de la dominante formulation (3<sup>ème</sup> année), qui a lieu d'octobre à avril, en partenariat avec un industriel. Ci-dessous, je présente la liste des projets de la dominante formulation que j'ai encadrés, en soulignant en gras ceux qui sont très proches de mes compétences de recherche.

- 1- *Etude d'un complément alimentaire : poudre d'antioxydants, Prosantum*  
Elèves : Roxane Bohn- Jacques-Marie de Chazelles, Siyamala Jagannathan)

- Partenaire extérieur : Laboratoire LPEV (2006-2007)*
- 2- *Boisson pour sportifs : Formulation d'une boisson de l'effort à base d'infusion de plantes*  
*Elèves : Astrid Chappellaz- Juliette Garcia- Céline Laye*  
*Partenaire extérieur: Société Rouages (2007-2008)*
  - 3- *Substitution du sel dans les produits de panification*  
*Elèves : Christine Dutter, Mariob Perrine, Elodie Saint Auret*  
*Partenaire extérieur : Société Nutraceutics and Services (2007-2008)*
  - 4- *Développement de bases aromatiques avec un substitut de sel, le KSalt (Substitut du sel)*  
*Elèves : Mélanie Ayroulet, Emeline Deverge, Solène Le Maux, Aurélie Legrand*  
*Partenaires extérieurs : Société Nutarceutics and Services / Fruitarom (2008-2009)*
  - 5- **Rôle de la lécithine dans le chocolat et solutions de remplacement**  
*Elèves : Cécile Hagenbach, Céline Hofleitner, Cécile Parlet, Anne-Laure Rouger*  
*Partenaires extérieurs : Barry Gallebaut- Institut Laue Langevin (2010-2011)*
  - 6- **Characterization of accelerated ageing to predict the lost of functionality of an enzymatically modified protein powder during its storage**  
*Elèves: Emmanuelle Dubuc, Lilia Karaoui, Karima Lemrabet, Valentine Vincenot*  
*Partenaire extérieur : Cargill (2010-2011)*
  - 7- **Formulation d'un complément alimentaire à base de microalgues**  
*Elèves : Julien Boudin, Antonin Gombart, Sébastien Haumaitre, Lucie Manin, Tiphaine Perret, Aurélie Tachon - Partenaire extérieur : Microphyt (2011-2012)*
  - 8- **Apport de la diffusion neutronique pour la caractérisation à l'échelle moléculaire du chocolat : exemple du remplacement du saccharose par des édulcorants dans le chocolat**  
*Elèves : Elodie Angelard, Claire Brochet, Aurélie David, Lucile Gehin, Emmanuelle Gorlin, Alice Leboullenger, Aïda Mourched - Partenaire : Cargill- Laboratoire Léon Brillouin (2012-2013)*
  - 9- **Vegetable proteins in dairy drinks for elderly people**  
*Elèves: Chloé Barré, Virginie Hebert, Christelle Welty*  
*Partenaire extérieur : Nestec (2014-2015)*
  - 10- **Whey protein hydrolysis : impact of preheating and analytical characterization**  
*Elèves: Marion Coussinet, Sabrina Jourdain, Aurélie Vallet*  
*Partenaire extérieur : Dupont-Danisco (2014-2015)*
  - 11- **Pastrami**  
*Elèves : Noémie Cailly, Pauline Mollon, Astrid Parent*  
*Partenaires extérieurs : Institut du Charolais et Parc Naturel régional du Morvan (2015-2016)*
  - 12- **Hemp by-products' valorization**  
*Elèves : Mehdeeyah Lalmahomed, Anaïs Roubot, Clément Sabatier*  
*Partenaire extérieur : La goutte d'or du plateau (2016-2017)*

Activités collectives associées à mon implication dans la formation d'ingénieurs :

- ✓ *Responsable du Module Chimie Analytique 1<sup>ère</sup> année d'ingénieurs (2009-2013)*
- ✓ *Co-Responsable du module chimie analytique et chimie des aliments (2013-..)*
- ✓ *Co-responsable du module optionnel « Nouvelles sources de protéines », 3<sup>ème</sup> année d'Ingénieurs (2013-...)*
- ✓ *Salon Grandes Ecoles d'Ingénieurs (Tous les ans)*
- ✓ *Journée Portes Ouvertes (Tous les ans)*
- ✓ *Agent Chargé de la mise en œuvre de l'hygiène et de la sécurité pour les enseignements de chimie (2006-2010)*
- ✓ *Responsable des relations avec le centre de documentation pour le DSAN- En charge de la négociation avec COUPERIN lors de la fusion de l'ENSBANA avec ENESAD (2006-2013)*

## 2. Les formations « autres »

En 2006, le Professeur Andrée Voilley, alors directrice de notre équipe de recherche, m'a demandé, à cause de ma connaissance des formations universitaires, de m'impliquer dans le parcours « Qualité des aliments » du master Nutrition Santé de l'Université de Bourgogne. Dans un premier temps, de 2006 à 2007, j'ai été responsable du module « Evaluation sensorielle - Chimie et Physicochimie - Procédés alimentaires ». En 2007, le professeur Jean Guzzo, m'a sollicité pour établir le programme de la première année de ce master qui passait dans la nouvelle mention « Qualité des Aliments et Sensorialité » master cogéré par l'UFR SVTE et l'ENSBANA. J'ai été co-responsable avec Georges Alves de ce M1 de 2007 à 2013. Dans ce M1 j'étais aussi responsable de deux modules: « Physicochimie et Génie des Procédés » et « DFAC : de la formulation au consommateur ».

En 2009, lors de la fusion de l'ENSBANA et de l'ENESAD, avec la création d'AgroSup Dijon, l'établissement est sorti de l'université de Bourgogne. J'ai alors été missionnée par le directeur d'AgroSup, Gérard Bouchot, pour devenir coordinatrice des « formations LMD co-habilitées, des mastères et formations qualifiantes » au sein de la Direction des Formations et de la Vie Etudiante (DFVE) (dont la directrice était le Professeur Nathalie Cayot). J'ai assuré cette responsabilité administrative pendant trois ans. Ma mission a consisté à :

- faire aboutir la convention des formations cohabilitées avec l'université de Bourgogne (4 licences professionnelles et 12 Masters)
- organiser le partage du travail entre les responsables de formations et la DFVE
- les actions de communication autour des masters spécialisés (4) et autres masters
- participer au projet stratégique de l'établissement pour le déploiement des formations autres et l'articulation avec la formation d'ingénieur
- et, de façon générale, assurer l'appui de la DFVE auprès des responsables de formation lors des rentrées, lors des renouvellements d'habilitation, pour l'élaboration des fiches RNCP...

### **3. Projet d'Enseignement**

#### **3.1. Master Recherche**

En 2016, pour la nouvelle habilitation du master Sciences des Aliments, il m'a été demandé par la direction d'AgroSup Dijon, de me charger du parcours recherche. En effet, la commission des titres d'ingénieurs, lors de la dernière évaluation AERES, avait souligné le fait que trop peu d'ingénieurs d'AgroSup Dijon se dirigeaient vers des thèses pour devenir Ingénieur-Docteur. Par conséquent, la direction souhaitait que dans le cadre de la nouvelle vague d'habilitation de la mention Sciences des Aliments (cohabilité entre ASD et l'UB), le parcours recherche SASC (Sciences des Aliments et Sciences du Comportement) soit revu pour faciliter un double parcours en troisième année entre les dominantes et notamment la dominante formulation et le master recherche. Nous avons donc travaillé avec Philippe Cayot, et les collègues enseignants chercheurs de l'équipe PCAV, à un projet de master centré sur la physicochimie des aliments et du vin. Pour des raisons de stratégie de recherche de l'établissement, et de transversalité de notre UMR PAM, il m'a été demandé de fusionner ce parcours avec celui proposé par les collègues microbiologistes des équipes Valmis et PMB. Nous avons donc revu notre copie avec Stéphanie Weidmann et Stéphane Guyot et avons travaillé au montage d'un master transversal à nos disciplines. Nous avons abouti à la création du Master MP<sup>2</sup> « Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes » qui comporte une première année commune et un parcours optionnel en deuxième année centré soit autour de la microbiologie et des procédés microbiologiques (option « New insights in microbiology and food processes »), soit une option centrée autour de la chimie et de la physicochimie des aliments et du vin (option « New insights in chemistry and physicochemistry for food design »). Ce master est cohabilité par l'Université de Bourgogne et AgroSup Dijon. La première année du master est en français et commune avec les autres parcours de la mention Nutrition-Sciences des Aliments. La deuxième année du master est en anglais et permet aux étudiants de partir faire un stage de 6 mois à l'étranger au second semestre. Les élèves ingénieurs d'AgroSup désireux de faire une thèse suivent les cours de cette deuxième année en alternance avec leur cours de dominante. Ils auront ainsi à la fin de leur cursus un double diplôme d'Ingénieur et de master. La première promotion de l'option microbiologie a ouvert en septembre 2017. Nous avons eu 10 inscrits dont deux ingénieurs.

#### **3.2. Internationalisation des formations**

En octobre 2017, nous avons postulé à l'appel à projet N°2 de l'Université Bourgogne Franche Comté portant sur les masters orientés recherche dispensés en langue anglaise. Le double objectif de cet appel à projet est de développer l'attractivité internationale et l'insertion des étudiants originaires de la région Bourgogne Franche-Comté. Il implique d'accroître l'offre de masters orientés recherche et dispensés en langue anglaise. Ces masters pourront servir de base au développement de masters conjoints avec des universités étrangères. Sur la base de la deuxième année de notre master recherche, MP<sup>2</sup>, et grâce aux contacts que j'avais pu établir avec l'université Chalmers à Göteborg en Suède mais aussi avec l'université de Salerne en Italie, nous avons déposé un projet de master en langue anglaise cette fois-ci sur deux ans, avec des échanges ERASMUS au second semestre du M1. Nous avons obtenu un financement sur 3 ans de 75 000 euros facilitant les échanges d'étudiants et d'enseignants. Le master MP<sup>2</sup> est donc maintenant dans la nouvelle mention de l'Université de Bourgogne Franche Comté, STAAE (Sciences et Technologie de l'Agriculture de l'Alimentation et de l'Environnement). Les étudiants de ce nouveau master en langue anglaise sur les deux années,

passent le premier semestre du M1 à Dijon. Ils suivent des cours en anglais centrés autour de la microbiologie, de la physicochimie et de la perception des aliments par le consommateur. Puis, au second semestre, ils partent pendant 6 mois via des accords ERASMUS de type « learning agreement » dans nos universités partenaires (Chalmers et Salerne, et d'autres...) pour commencer à se spécialiser en microbiologie et physicochimie. Au retour en deuxième année, ils suivent le programme d'une des deux options MP<sup>2</sup>. Puis ils peuvent faire leur stage de fin de master (master tesi) dans nos laboratoires ou à l'étranger. L'objectif, après les trois années de financement, est d'obtenir le label Master MUNDUS avec les deux partenaires européens, donc, cette fois ci, un co-diplôme.

## IV. Conclusion

Pour m'aider à conclure ce mémoire, j'ai choisi trois textes représentatifs de l'état d'esprit qui est le mien suite à ce bilan sur mes activités de recherche et d'enseignement passées et qui je l'espère me permettront de discuter avec le jury de la situation des laboratoires de recherche universitaires français et par conséquent du cadre de mes activités futures, donc de la réalisation de mon projet.

*La source tombait du rocher  
Goutte à goutte à la mer affreuse.  
L'Océan, fatal au rocher,  
Lui dit : Que me veux-tu, pleureuse ?*

*Je suis la tempête et l'effroi ;  
Je finis où le ciel commence.  
Est-ce que j'ai besoin de toi,  
Petite, moi qui suis l'immense ?*

*La source dit au gouffre amer :  
Je te donne, sans bruit ni gloire,  
Ce qui te manque, ô vaste mer !  
Une goutte d'eau qu'on peut boire.*

**Victor Hugo, La source tombait du rocher.**

Au travers de ce poème de Victor Hugo, je souhaite illustrer mes interrogations sur le paysage des laboratoires en France. Les activités de recherche que j'ai présentées dans ce mémoire ont toutes été en partie réalisées dans notre laboratoire universitaire, équipe d'accueil labellisée par AgroSup Dijon et l'Université de Bourgogne, mais en collaboration avec des collègues des grands instituts de recherche que sont le CEA, le CNRS, et l'institut Max Planck en Allemagne. Je ne pense pas que nous aurions pu avoir les budgets nécessaires pour financer seuls ces activités de recherche. Pour autant, notre équipe a souvent été à l'initiative de ces projets, qui pouvaient se trouver à la marge des thèmes des programmes de recherche pilotés par les grands instituts. Aujourd'hui, le mode de financement de notre équipe universitaire, avec le désengagement de nos tutelles, nous incite à nous diriger de plus en plus vers des contrats industriels. Pour la collaboration avec les grands instituts, si elle perdure, cela nous permet de les alimenter en sujets d'applications, et de valider leurs projets (ANR, européens etc..) en termes de recherche à finalité appliquée, ce qui est de plus en plus demandé même aux grands instituts. Pour notre équipe, il est de plus en plus difficile de travailler sur des systèmes modèles et nous nous rapprochons de plus en plus de l'application. Nous représentons modestement depuis plusieurs années la goutte d'eau que l'océan peut boire (industriels ou grands instituts !). Le risque est qu'à force de passer de contrats industriels à contrats industriels, nous ne soyons plus capables d'assurer une continuité dans nos activités de recherche, et que nous soyons pilotés par les activités et impératifs des industriels qui ne sont pas toujours en adéquation avec la recherche universitaire. D'autre part, ces contrats sont souvent basés sur des accords de confidentialité, qui peuvent aller à l'encontre de la nécessaire discussion et animation scientifique d'une équipe. Chacun d'entre nous a certes de nombreux contrats et des collaborations avec des grands instituts sur des thèmes de recherche communs mais quid de notre collectif et comment gérer notre prochaine habilitation ?

*Je sais qu'ignorer fait bien dans le tableau.  
Je sais que les mots science et raison,  
Dont les abus certains n'excusent rien,  
Sont à l'heure qu'il est,  
Par beaucoup jetés à la poubelle.  
Je tiens à l'honneur  
D'aller avec ces mots  
Dans ces poubelles-là.*

*Si chacun en faisait autant  
Dans le domaine où il est maître,*

*Pas mal de choses iraient mieux  
Qu'elles ne vont dans le monde,  
Et il y aurait moins de charlatans  
Pour prêcher l'excellence de la charlatanerie  
Aux applaudissements des badauds.*

**Louis Aragon, préface de son recueil de poèmes, *Les Yeux d'Elsa*.**

Le deuxième texte, est la préface écrite par d'Aragon de son recueil de poèmes « Les Yeux d'Elsa » en Avril 1942. Il me permet d'évoquer mes interrogations sur les difficultés que nous rencontrons à susciter aujourd'hui des vocations scientifiques, qui plus est dans le domaine de l'agroalimentaire et vers les métiers de la recherche, donc vers le doctorat. Il me semble que pourtant les défis de l'époque, nécessitent de plus en plus de compétences scientifiques et techniques. Comme le dit Aragon dans son texte, il est important tout d'abord de lutter contre les préjugés de l'époque sur la science. Il faut donc participer à des activités de vulgarisation scientifique pour expliquer nos recherches, notre métier, et présenter les avancées de la connaissance dans nos domaines d'application. Les sciences des aliments sont pour cela des disciplines faciles, des expériences qui parlent à tous peuvent être réalisées et doivent être menées par les chercheurs du domaine en collaboration avec des communicants...mais pas par des communicants seuls !...Pour la recherche et la formation par la recherche, la tâche est plus ardue car le métier de chercheur est souvent mal perçu par le grand public, et les débouchés des doctorats sont souvent méconnus. Là encore, il faut communiquer, et peut être même commencer au sein de l'université, et auprès des étudiants qui connaissent peu la casquette de chercheurs de leurs professeurs.

*« Plus que jamais, le développement et la qualité de vie d'une nation dépendront de son niveau culturel et scientifique, lui-même largement dépendant de la valeur de son enseignement supérieur... Sans uniformiser leurs systèmes, les pays d'Europe devront définir un modèle européen spécifique, ni bureaucratique ni asservi au marché. Lui seul aura la taille nécessaire pour maîtriser la mondialisation et promouvoir les valeurs propres à un continent où fut, pour la première fois dans l'histoire moderne, établie une université. »*

***Pour un modèle européen d'enseignement supérieur, Rapport de la Commission présidée par Jacques Attali, 1998.***

C'est dans ce cadre et avec cet état d'esprit, que j'ai accepté d'être en charge d'un des masters internationaux à finalité recherche de la COMUE UBFC. Je pense que les débouchés à l'international sont de très bonnes opportunités pour les étudiants et j'ai espoir que les étudiants étrangers ramènent du dynamisme et de l'optimisme sur la perception de la formation par la recherche. Il me reste un questionnement sur le passage de tous nos enseignements de master en anglais, pour pouvoir accueillir et former les étudiants à l'international. N'allons-nous pas appauvrir la richesse de nos diverses façons de faire et d'enseigner les sciences en Europe au travers de ce passage au tout en anglais ?

# Bibliographie

- Alves A.B., Bragagnolo N., Da Silva M.G, Skibsted L.H., Orlie V., Food and Bioproducts processing, 90 (2010) 499-505, Antioxidant protection of high-pressure processed minced chicken meat by industrial tomato products
- Aregawi W., Defraeye T., Saneinejad S., Vontobel P., Lehmann E., Carmeliet J., Derome D., Verboven P., Nicolai B., International Journal of Heat and Mass Transfer, 67 (2013) 173-182, Dehydration of apple tissue : Intercomparison of neutron tomography with numerical modelling
- Assifaoui A., Champion D., Chiotelli E., Verel A., Carbohydrate Polymers, 64 (2006) 197-204, Characterization of water mobility in biscuit dough using a low-field 1H NMR technique
- Assifaoui A., Huault L., Maissiat C., Roullier-Gall C., Jeandet P., Hirschinger J., Raya J., Lambert J-F., Jaber M., Cayot P., Gougeon R., Loupiac C., RSC Advances, 4 (2014) 61096- 61103, Structural studies of adsorbed protein (Betalactoglobulin) on natural clay (Montmorillonite)
- Bendall J.R, Restall D.J., Meat Science, 8(2) (1983) 93-117, The cooking of single myofibres, small myofibre bundles and muscle strips from beef M. Psoas and M. Sternomandibularis Muscles at varying heating rates and temperatures
- Brownlow S., Morais Cabral J.H., Cooper R., Flower D-R., Yewdall S-J., Polikarpov I., North A CT., Sawyer L., Structure, 5(4) (1997) 481-495, bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin
- Cases, E. and Cayot, P., Food Hydrocolloids 19 (2005) 165–170, Effect of apolar phase dielectric constant on interfacial properties of b-lactoglobulin (dielectric constant and interfacial properties of b-lactoglobulin)
- Cases E., Rampini C., Cayot P., Journal of Colloid and Interface Science 282 (2005) 133-141, Interfacial properties of acidified skim milk
- Cayot P., Courthaudon J-L, Lorient D., J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1369-1373, Emulsifying properties of pure and mixed  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -casein fractions: effects of chemical glycosylation
- Cayot P., Fairise J-F., Colas B., Lorient D., Brulé G., J. Dairy Res., 70 (2003) 423-431, The improvement of rheological properties of firm acid gels by skim milk heating is conserved after stirring
- Champion D., Loupiac C., Russo D., Simatos D., Zanotti J-M, Journal of Thermal Analysis 104 (1) (2011) 365-374, Dynamic and sub-ambient thermal transition relationships in water–sucrose solutions. Differential scanning calorimetry and neutron scattering analysis
- Champion D., Loupiac C., Simatos D., Lillford P., Cayot P., Food Biophysics, 6(1) (2011) 160-169, Structural relaxation during drying and rehydration of food materials : the water effect and the origin of hysteresis
- Champion D., Loupiac C., Industries Alimentaires et Agricoles, Nov.-Déc (2012) 4-6, Structuration et stabilité des protéines dans les aliments: rôle clé de l'eau
- Champion D., Lebrete A., Loupiac C., Karbowski T., Roudaut G., Industries Alimentaires et Agricoles, Nov.-Déc. (2012) 20-23, Nouvelles approches d'étude de la dynamique de l'eau dans les matrices alimentaires faiblement hydratées
- Chen C.R., G.I. Makhatadze, Nature Communications, 8 :14561 (2017) 1-9, Molecular determinant of the effects of hydrostatic pressure on protein folding stability



- Cruz-Romero M., Smiddy M., Hill C., Kerry J.P., Kelly A.L., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5 (2004) 161-169, Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (*Crassostrea gigas*)
- Devineau S., Zanotti J-M., Loupiac C., Zargarian L., Neiers F., Pin S., Renault J-P., S., *Langmuir*, 29 (44) (2013) 13465–13472, Myoglobin on silica: a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics
- Diehl M., Doster W., Petry W., Schober H., *Biophys. J.*, 73 (5) (1997) 2726-2732, Water-coupled low frequency modes of myoglobin and lysozyme observed by inelastic neutron scattering
- Fourme R., Hamel G. Loupiac C., Perriet-Cornet J-M., Pin S., Roche S., dans "Hautes pressions: les nouveaux enjeux", MRCT-CNRS Editions, (2012) 31-56, La biologie sous pression: de la molécule au procédé
- Fox K.K., Holsinger V.H., Posati L.P., Pallansch M.J., *Journal of Dairy Science*, 50 (1967) 1363-1367, Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from other Milk Serum Proteins by trichloroacetic Acid
- Frye K.J., Royer C., *Protein Science* 7 (1998) 2217-2222, Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure
- Gaiani C. Morand M., Sanchez C., Arab Tehrany E., Jacquot M., Jeantet R., Scher J., *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 75 (2010) 377-384, How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature
- Guzun-Cojocaru T., Koev C., Yordanov M., Karbowski T., Cases E., Cayot P., *Food Chemistry*, 125 (2011) 326-333, Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface
- Halle B., *Phil. Trans.R. Soc. London B*, 359 (2004) 1207-1224, Protein hydration dynamics in solution : a critical survey
- Holmgaard Bak K., Lindahl G., Karlsson A.H., Lloret E., Ferrini G., Arnau J., Orlie V., *Meat Science* 90 (2012) 690–696, High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH and NaCl
- Houzé G., Cases E., Colas B., Cayot P., *International Dairy Journal* 15 (2005) 1006–1016, Viscoelastic properties of acid milk gel as affected by fat nature at low level
- Junghans A., Köper I., *Langmuir* 26(13) (2010) 11035-11040, Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes
- Junghans A., Champagne C., Cayot P., Loupiac C., Köper I., *Langmuir* 27 (2011) 2709-2716, Probing protein-membrane interactions using solid supported membranes
- Karbowski T., Gougeon R., Alinc J-B, Brachais L., Debeaufort F., Voilley A., Chassagne D., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (2010) 20-52, Wine oxidation and the role of cork
- Kinsella, J. E., & Whitehead, D. M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advanced in Food Nutrition Research*, 33, 343–438
- Kohlbrecher J., Bollhalder A., Vavrin R., *Review of Scientific Instruments*, 78(12) (2007) 125101- , A high pressure cell for small angle neutron scattering up to 500 MPa in combination with light scattering to investigate liquid sample
- Köper I., *Molecular Biosystems*, 3 (2007) 651-657, Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane protein

Lagorce-Tachon A., Karbowiak T., Loupiac C., Gaudry A., Ott F., Alba-Simionesco C., Gougeon R.D., Alcantara V., Mannes D., Kaestner A., Lehmann E., Bellat J-P., *Journal of Food Engineering*, 149 (2014) 214-221, The cork viewed from the inside

Le Godec Y., Loupiac C., Prat A., Edition MRCT-CNRS, (2012) 701-10-1, Hautes Pressions: les nouveaux enjeux, ISBN: 978 2- 918

Lequin S., Chassagne D., Karbowiak T., Gougeon R., Brachais, J. *Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 3438-3445, Adsorption equilibria of water vapor on cork

Li J., Kolesnikov A., *J. Molec. Liquids*, 100 (2002) 1-39, neutron spectroscopic investigation of dynamics of water ice

Loupiac C., Bonetti M., Pin S., Calmettes P., *European Journal of Biochemistry*, 269 (2002) 1-7, High-pressure effects on horse heart metmyoglobin studied by small-angle neutron scattering

Loupiac C., Bonetti M., Pin S., Calmettes P., dans *Outils et méthodes pour la recherche à haute pression*, CNRS Editions, (2005) 82-86. Mesures de diffusion de neutrons aux petits angles pour étudier l'effet des hautes pressions sur la structure des protéines globulaires

Loupiac C., Bonetti M., Pin S., Calmettes P., *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, 1764 (2006) 211-216, Beta-lactoglobulin under high pressure studied by small-angle neutron scattering

Loupiac C., *Neutron News*, 23(2) (2012) 22-24, How neutron scattering experiments can target the behavior of milk proteins

Loupiac C., *Current Opinion In Food Science*, 9 (2016) 93-97, How neutron scattering experiments can target the structure and dynamics of milk proteins?

Medina-Meza I.G., Barnaba C., Barbosa-Canovas G.V., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22 (2014) 1-10, Effects of high pressure processing on lipids oxidation : a review

Messens W., Van Camp J., Huyghebaert A., *Trends in Food Science and Technology* 8 (1997) 107-112, The use of high pressure to modify the functionality of food proteins

Oey I., Lille M., Van Loey A., Hendrickx M., *Trends in Food Science & Technology* 19 (2008) 320-328, Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review

Ott F., Loupiac C., Desert S., Helary A., Lavie P., *Physics Procedia*, 69 (2015) 67-70, IMAGINE: a cold neutron imaging station at the Laboratoire Léon Brillouin

Poirier-Brulez F., Roudaut G., Champion D., Tanguy M., Simatos D., *Biopolymers*, 81 (2006) 63–73, Influence of sucrose and water content on molecular mobility in starch-based glasses as assessed through structure and secondary relaxation

Roche J., Caro J.A., Norberto D.R., Barthe P., Roumestand C., Schlessman J.L., Garcia A.E., Garcia-Moreno B.E., Royer C.A., *PNAS* 109(18) (2012) 6945-6950, Cavities determine the pressure unfolding of proteins

Rupley J. A., Careri, G., *Adv. Protein Chem.*, 41 (1991) 37–172, Protein hydration and function

Russo D., Ortore M.G., Spinozzi F., Mariani P., Loupiac C., Annighoher B., Paciaroni A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (2013) 4974-4980, The impact of high hydrostatic pressure on structure and dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin

Schindler S., Krings U., Berger R., Orlie V., *Meat Science*, 86 (2010) 317-323, Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated

Schuck P., *Le Lait*, 82 (2002) 375-382, Spray drying of dairy products : state of the art

Scussat S., Ott F., Helary A., Desert S., Cayot P., Loupiac C., *Food Biophysics*, 11(3) (2016) 207-212, Neutron imaging of meat during cooking

Scussat S., Vaulot C., Ott F., Cayot P., Delmotte L., Loupiac C., *Food Structure*, 14 (2017) 36-45, The impact of cooking on meat microstructure studied by low field NMR and Neutron Tomography

Seuvre A-M., Espinosa Diaz M-A, Cayot P., Voilley A., *Le Lait* 84, (2004) 1-12, Influence of the composition and the structure of different media on the release of aroma compounds. Role of gelation and fat globules

Sinner E-K., Knoll W., *Current opinion in chemical biology*, 5 (2001) 705-711, Functional tethered membranes

Tanoi K., Hamada Y., Seyama S., Saito T., Iikura H., Nakanishi T.M., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 605 (2009) 179-184, Dehydration process of fish analyzed by neutron beam imaging

Teixeira J., Magli R., Loupiac C., *Eur. J. Mineral.*, 27 (2015) 289-296, Neutron scattering and imaging: a tool for archaeological studies

Torres J.A., Velasquez G., *Journal of Food Engineering* 67 (2005) 95-112, Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods

Yang J., Dunker A.K., Powers J.R., Clark S., Swanson B.G., *J. Agriculture and Food Chem.* 49 (2001) 3236-3243,  $\beta$ -Lactoglobulin Molten Globule Induced by High Pressure