Propriétés fonctionnelles de protéines végétales, en volume et aux interfaces fluides

Alexandre Poirier

▶ **To cite this version:**

Alexandre Poirier. Propriétés fonctionnelles de protéines végétales, en volume et aux interfaces fluides. Autre [cond-mat.other]. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTS005 . tel-02294174

HAL Id: tel-02294174
https://theses.hal.science/tel-02294174

Submitted on 23 Sep 2019

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Physique

École doctorale : Information, Structures, Systèmes

Unité de recherche : Laboratoire Charles Coulomb

Propriétés fonctionnelles de protéines végétales, en volume et aux interfaces fluides

Présentée par Alexandre POIRIER

Le 2 Avril 2019

Sous la direction de Laurence RAMOS

Devant le jury composé de

Cécile MONTEUX, Chargée de Recherche CNRS, ESPCI, Paris	Rapportrice
Stéphane PEZENNEC, Chargé de Recherche INRA, STLO, Rennes	Rapporteur
Dominique LANGEVIN, Directrice de Recherche émérite CNRS, LPS, Orsay	Examinatrice
Jan VERMANT, Professeur, ETH, Zurich	Examinateur
Antonio STOCCO, Chargé de Recherche CNRS, ICS, Strasbourg	Invité
Olivier GALET, Responsable R&I, Groupe Avril	Invité
Amélie BANC, Maître de Conférence, L2C, Montpellier	Encadrante
Laurence RAMOS, Directrice de Recherche CNRS, L2C, Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le résultat de plusieurs années de travail, l'aboutissement d'une formation professionnelle et d'un cheminement personnel. Les remerciements sont donc de mises...

Je tiens d'abord à remercier Martin In qui m'a proposé de réaliser ce projet de thèse dont il est l'auteur. Nos nombreuses conversations ont été pour moi autant de souffles et d'apprentissages permettant d'accomplir ce travail.
Ce projet de thèse à été confié à Amélie Banc et Antonio Stocco, sous la direction de Laurence Ramos. Je remercie particulièrement Antonio qui nous a grandement aidé. Merci pour ta disponibilité, nos conversations fructueuses m'ont beaucoup appris. Merci à Amélie et Laurence qui ont montré leur intérêt par le temps passé durant ces trois années pour m'expliquer, préciser et améliorer ce que nous faisions. Vous m'avez donné une rigueur expérimentale, le sens de l'organisation et bien d'autres choses ! Les méthodes proposées pour conduire ce projet ont pu varier en montrant chacune leur efficacité et je les retiendrai.

Merci à Caroline Hillairet et Nathalie Vouillon qui ont assuré le lien entre l'institut PIVERT et le laboratoire où s'est déroulé la thèse. Nos réunions se sont toujours faites dans la bonne humeur et c'était un plaisir de rencontrer les personnes d'autres projets porter par l'institut.
Lors de ces réunions j'ai eu le plaisir de rencontrer Fernando Léal Calderon, Wafa Dridi ainsi que Romain Kapel que je remercie pour leur sympathie et leur intérêt aux présentations de nos travaux. Ces réunions ont été l'occasion d'en apprendre beaucoup sur les sujets connectés à cette thèse. Merci à Odile Messieres et Mélody Basselin qui ont participé à ce projet par leur travail et leur réponses toujours bienvenues.

Je remercie chaleureusement Stéphane Pézennec qui a suivi l'évolution de la thèse durant ces trois années et a accepté d'en être rapporteur. Ce suivi était vitale pour nous aiguiller sur la bonne voie. Merci également à Cécile Monteux pour sa lecture détaillée du manuscrit et l'interêt qu'elle à porter à ce travail. Je remercie aussi les autres membres du jury, Dominique Langevin avec qui j'ai eu la chance de pouvoir discuter hors des procédures de la soutenance, ce fût très éclairant. Merci à Jan Vermant pour sa précision et sa pertinence ainsi qu'à Olivier Galet pour son apport sur le contexte et les enjeux industriels derrière les sujets de cette thèse.

Mes remerciements se dirigent ensuite vers l'équipe matière molle du laboratoire et ses agents de

l'ombre comme Adoration et Béatrice qui sont d'une grande aide pour solutionner les rubik's-cube administratif en tout genre. Merci à Jean-Christophe, toujours disponible pour dépanner et efficace. Merci beaucoup à Ty pour la permanence de sa bonne humeur et son aide toujours bienveillante. Merci à Jean-Marc pour sa sympathie et sa camaraderie. Un grand merci à Najma qui a toujours été chaleureuse, malgré son travail débutant plusieurs heures avant tout le monde pour que nous marchions sur un sol propre. L'importance et les conditions de son travail ne sont pas comparables à ce qu'il a fallu pour réaliser cette thèse.
Dans cette équipe, je remercie tout spécialement les non permanents, avec qui j'ai pu partager ces quelques années au laboratoire Charles coulomb, de l'ancienne génération jusqu'à la nouvelle. Merci à Dario, Adrian, Luca, Clara, Sristhi, Stefano M, Haïfa, Camilo, Anthony, Benjamin, Alexey, Stefano V, Angelo, Marian, Myriam, Ameur, Alessandro, Carole Ann, Laura, Asma pour tous ces moments de vie, petits ou grands.

Je veux remercier ma famille et en particulier mes parents pour leur aide permanente et durable.

Merci à Ahlem, ma femme, pour m'avoir soutenu dans tous les moments et bien plus encore...

RÉSUMÉ

Les enjeux de santé publique et de développement durable conduisent à intensifier l'utilisation de protéines végétales notamment dans les secteurs de biens de consommation comme l'industrie pharmaceutique, l'agro-alimentaire et les cosmétiques. La levée récente de certains verrous technologiques permet aujourd'hui la purification industrielle de protéines végétales issues de tourteaux provenant de la production d'huiles végétales. Ces protéines sont valorisables comme substituts aux graisses saturées dans la structuration d'huiles à destination de la consommation humaine. Le manque de texture d'huiles végétales insaturées peut être compensé par ces protéines jouant le rôle de stabilisants et de gélifiants dans les émulsions. Nous nous intéressons aux propriétés fonctionnelles des protéines de blé, de tournesol et de colza, en volume et aux interfaces. Nous avons montré que des gels de protéines de tournesol avec des élasticités modulables sont obtenus par dénaturation thermique. La dynamique de formation de films protéiques aux interfaces fluides a été étudiée en combinant des mesures de tensiométrie, de viscoélasticité dilatationnelle et d'ellipsométrie. Les mesures sur plusieurs ordres de grandeurs en concentrations et en temps mettent en évidence différents régimes de structuration associés à différentes dynamiques d'adsorption pour les trois protéines de blé, de tournesol et de colza étudiées. Nous discutons également le rôle de la flexibilité des protéines dans ces différents régimes de structuration.

Mots clés : Protéines végétales, Gluten, Tournesol, Colza, Interface, Gel, Tension de surface dynamique, Rhéologie, Rhéologie interfaciale, Ellipsométrie.

Avertissement :
Ce document est confidentiel, et a été réalisé dans le cadre du programme de recherche GENESYS de la SAS PIVERT. Il ne peut être ni reproduit ni exploité sans l'autorisation expresse de la SAS PIVERT.

Challenges of public health and sustainable development trend to intensify the use of vegetables proteins, particularly in consumer goods sectors such as pharmaceutical, food and cosmetics industries. The recent overcome of technical limitation allows the industrial purification of vegetables proteins derived from meal made by vegetable oils production. These proteins are valuable as substitutes for saturated fats in structuring oils for human consumption. The lack of unsaturated vegetable oil texture can be reduced by these proteins acting as stabilizers and gelling agents in emulsions. We are interested in the functional properties of wheat, sunflower and rapeseed proteins, by volume

and at interfaces. We have shown that sunflower protein gels with modulable elasticities are obtained by thermal denaturation. In addition, we studied the dynamics of protein film formation at fluid interfaces by combining measurements of tensiometry, dilatational viscoelasticity and ellipsometry. We highlight different structuring regimes and discuss the role of protein flexibility in this structuring.

Keywords : Plant proteins, Gluten, Sunflower, Rapeseed, Interface, Gel, Dynamic surface tension, Rheology, Interfacial Rheology, Ellipsometry.

Disclaimer :
This document is confidential and was prepared within the frame of the GENESYS research program of the SAS PIVERT. No copy, no distribution, and no exploitation are allowed without the authorization of the SAS PIVERT

Table des matières

Introdution 11

1. Motivations et état de l'art 15

1.1 Les protéines 15

1.2 L'interface 18

1.2.1 Equation d'état, isotherme d'adsorption 20

1.2.2 Dynamique d'adsorption 21

1.2.3 Structuration du film protéique 26

1.2.4 Rhéologie interfaciale 30

1.3 Les Protéines d'intérêt 34

1.3.1 Protéines de réserve du blé 34

1.3.1.1 Extraction 34

1.3.1.2 Structures 35

1.3.1.3 Propriétés fonctionnelles 36

1.3.2 Protéines de réserve du tournesol 39

1.3.2.1 Extraction 39

1.3.2.2 Structures 41

1.3.2.3 Propriétés fonctionnelles 43

1.3.3 Protéines de réserve du colza 45

1.3.3.1 Extraction 46

1.3.3.2 Structures 47

1.3.3.3 Propriétés fonctionnelles 48

1.4 Objectifs du travail de thèse 51

2. Méthodes expérimentales et matériaux utilisés 53

2.1 Méthodes 53

2.1.1 Réfractométrie 53
2.1.2 Analyse thermique 55
2.1.3 Diffusion dynamique de la lumière 56
2.1.4 Ellipsométrie à extinction 60
2.1.4.1 Modèle en couches stratifiées 63
2.1.4.2 Théorie des perturbations 64
2.1.4.3 Protocoles de mesures 66
2.1.5 Microscopie à angle de Brewster 69
2.1.6 Tensiométrie 70
2.1.6.1 Méthode de la goutte pendante 70
2.1.6.2 Rhéologie interfaciale dilatationnelle 70
2.1.6.3 Lavage de la goutte 72
2.1.6.4 Protocoles de mesures 73
2.1.6.4.1 Stabilité et propreté de la mesure 73
2.1.6.4.2 Domaine de linéarité, rhéologie interfaciale 74
2.1.6.4.3 Lavage de goutte 74
2.1.6.4.4 Mesure dynamique de tension de surface 75
2.1.7 Plaque de Wilhelmy 75
2.2 Matériels 77
2.2.1 Composés chimiques 77
2.2.2 Gliadines de blé 79
2.2.2.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions 79
2.2.2.2 Composition protéique de l'isolat 80
2.2.2.3 Propriétés optiques de l'isolat en solution 81
2.2.3 Globulines et albumines de tournesol 81
2.2.3.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions 81
2.2.3.2 Composition protéique de l'isolat 82
2.2.3.3 Propriétés optiques de l'isolat en solution 84
2.2.4 Albumines de colza 85
2.2.4.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions 85
2.2.4.2 Composition protéique de l'isolat 86

3. Solubilité, propriétés en solution et gélification . . . 89
3.1 Isolat de blé . . . 89
3.2 Isolat de tournesol . . . 91
3.2.1 Solubilité . . . 91
3.2.2 Rayons hydrodynamiques . . . 93
3.2.3 Températures de dénaturation . . . 96
3.2.4 Gélification induite par traitement thermique . . . 97
3.2.4.1 Criblage des conditions physico-chimiques . . . 97
3.2.4.2 Caractérisation rhéologique . . . 101
3.3 Isolat de colza . . . 104
3.3.1 Solubilité . . . 104
3.3.2 Rayons hydrodynamiques . . . 105
3.3.3 Température de dénaturation . . . 107
3.3.4 Criblage des conditions physico-chimiques de gélification . . . 108
3.3.5 Séparation de phases liquide/liquide . . . 110
3.4 Conclusion . . . 112

4. Gliadines à l'interface air/eau . . . 115
4.1 Publication . . . 115
4.2 Déplétion du volume, effet de courbure . . . 126
4.3 Temps de latence . . . 128
4.4 Mesures annexes . . . 129
4.4.1 Rhéologie de cisaillement du film interfacial . . . 129
4.4.2 Variation de composition gliadines/gluténines . . . 130

5. Isolat protéique de tournesol aux interfaces air/eau et huile/eau . . . 133
5.1 Mesures expérimentales et premières analyses . . . 133
5.1.1 Pression de surface en fonction du temps . . . 133
5.1.2 Profil optique . . . 136
5.1.3 Construction de courbes maîtresses . . . 140
5.2 Modélisation cinétique . . . 143
5.2.1 Période d'induction, premiers temps de latence . . . 143
5.2.2 Courbes maîtresses . . . 145

5.2.3 Modélisation cinétique issue du profil optique 147
5.3 Modélisation structurale 149
5.3.1 Profil optique sur 1 h 149
5.3.2 Profil optique à temps plus long (61 h) 152
5.3.3 Turbidité d'une goutte pendante 153
5.4 Viscoélasticité dilatationnelle interfaciale 155
5.5 Discussion et conclusion 156

6. Discussion : Cinétiques d'adsorption et évolutions structurales de protéines végétales aux interfaces fluides 160
6.1 Courbes maîtresses 160
6.2 Temps de latence 161
6.3 Concentration superficielle d'excès 163
6.4 Rhéologie dilatationnelle des films protéiques 164
6.5 Conclusion 168

Conclusion 169

Annexe 171

A. Caractérisation de l'isolat de tournesol à 91 % 172
A.1 Composition en protéines 172
A.2 Solubilité de l'isolat 173
A.3 Rayons hydrodynamiques 174
A.4 Température de dénaturation 175

B. Rhéologie du film protéique avec échange de volume à différents pH 178

C. Influences de la pureté de l'isolat de colza 180
C.1 Temps de latence 181
C.2 Courbes maîtresses de pression de surface 182
C.3 Courbes maîtresses de viscoélasticité dilatationnelle 183
C.4 Conclusion 184

INTRODUCTION

Les productions mondiales d'huiles de tournesol et de colza font parties des cinq plus grandes productions d'huiles végétales et constituent à elles deux 25% de la production mondiale d'huiles végétales (2010, Food and Agriculture Organization of the United Nations : www.fao.org). La France a des rendements à l'hectare parmi les meilleurs du monde ce qui la place dans les positions de 4ème productrice mondiale de colza, 9ème productrice de tournesol et 5ème productrice mondiale de blé en 2017 (www.fao.org). Parmi les productions d'huiles végétales en france, 70 % proviennent du colza (Huileries et margarineries de France, www.fncg.fr). Après cette trituration permettant d'extraire l'huile, les tourteaux de tournesol et de colza, riches en protéines (30 - 40 %), sont aujourd'hui principalement destinés à l'alimentation animale. Cependant, les avancées récentes des procédés de purification permettent l'obtention, à l'échelle industrielle, d'isolats riches à plus de 80 % en protéines. Cela rend ces tourteaux purifiés valorisables dans les secteurs de consommation comme l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmaceutique en tant qu'agent moussant, émulsifiant [1, 2] et gélifiant [3, 4]. Les propriétés texturantes de certaines huiles comme l'huile de palme vient de sa teneur riche en acides gras saturés qui ont des effets délétères sur la santé, tout comme les huiles animales que l'on a un temps préconisé de remplacer par des huiles végétales hydrogénées. L'hydrogénation des huiles végétales, outre qu'elle aboutit à des acides gras saturés, induit aussi la formation de double liaison -trans dont les effets néfastes sur la santé sont avérés notamment sur le profil lipoprotéique dans le plasma. Les huiles saturées et insaturées -trans augmentent le niveau de LDL (low density lipoproteins, le mauvais cholestérol) et abaissent le niveau de HDL (high density lipoproteins, le bon cholestérol) [5]. Les enjeux de développement durable et de santé publique induisent un besoin de substitution d'huiles et graisses saturées, solides à température ambiante, vers des huiles insaturées comme les huiles végétales, insaturées. Les propriétés de texture insuffisantes de ces huiles végétales peuvent être compensées par divers procédés. La texturation peut se faire par production d'émulsions d'huile dans l'eau avec comme agents émulsifiants les protéines issues de la production d'huiles végétales. Cela peut être combiné à la gélification de la phase aqueuse de ces émulsions. L'aptitude émulsifiante et parfois gélifiante des protéines, peut être potentiellement valorisable par la texturation d'huiles végétales. Le projet de thèse s'inscrit dans un projet plus large répondant à l'appel d'offre de l'institut de transition énergétique PIVERT (Picardie Innovations Végétales, Enseignements et Recherches Technologiques). Ce projet de thèse vise à améliorer la compréhension des propriétés fonctionnelles de surface des protéines de blé, de tournesol et de colza. L'étude présentée dans ce manuscrit porte sur la cinétique de formation de films aux interfaces fluides (air/eau et huile/eau) par adsorption des protéines initialement présentes en solution à différentes concentra-

tions. La gélification par dénaturation thermique des protéines de tournesol et de colza a également été étudiée. Les isolats de tournesol et de colza ont été purifiés au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres et Mélody Basselin), basé à Vandoeuvre-lès-Nancy. Ces isolats ont été fournis après le début de la thèse, c'est pourquoi l'isolat de blé, bien connu de l'équipe et disponible immédiatement, a également fait objet d'une étude.

Le premier chapitre présente les notions nécessaires aux études sur les protéines en général et le milieu interfacial. Il décrit la modélisation des cinétiques d'adsorption et la rhéologie de films protéiques interfaciaux. La littérature existante sur les évolutions structurales de films protéiques, la dynamique d'adsorption des protéines et la rhéologie du film sera abordée. La structure des protéines d'intérêts, les procédés d'extraction existant et les propriétés fonctionnelles de ces protéines sera mentionnée ,enfin le chapitre rappelle les motivations du travail de thèse.

Le deuxième chapitre est dédié aux différentes méthodes et techniques utilisées pour l'étude aux interfaces air/eau et huile/eau. Les techniques utilisées pour évaluer différentes grandeur des protéines en solution seront également décrites. La description quantitative des protocoles de purification et des isolats ainsi produits sera mentionnée.

Le troisième chapitre se focalise sur les propriétés en volume des isolats protéiques. La solubilité des isolats en solution est évaluée ainsi que les rayons hydrodynamiques des espèces solubilisées. Les températures de dénaturation des isolats sont mesurées et un criblage des conditions physico-chimiques permettant la formation d'un gel par dénaturation thermique est effectué. L'évolution des propriétés rhéologiques d'une solution d'isolat de tournesol est effectuée au cours de la dénaturation thermique.

Le quatrième chapitre présente l'étude interfaciale d'une solution de protéines de blé (gliadines) en solvant acétique à pH 3, à l'interface air/eau. Les mesures de pression de surface sont effectuées sur cinq ordres de grandeur en concentrations, de 0.001 g/L à 110 g/L et quatre ordres de grandeur en temps, jusqu'à 10000 s, par méthode de la goutte pendante. Les mesures de rhéologie dilatationnelle interfaciale et de profil optique donnent accès à un scénario de la formation du film protéique. Trois régimes sont identifiés et délimités par les changements de pentes du module élastique. Cette étude a été publiée dans le journal suivant Journal of Colloid and Interface Science 526 (2018) 337 – 346, et porte le nom "Multistep building of a soft plant protein at the air-water interface". L'article est ajouté à ce chapitre qui apporte quelques informations complémentaires.

Le cinquième chapitre présente l'étude de l'interface air/eau et hexadécane/eau d'une solution d'isolat de tournesol en solvant hydroxyde de sodium à pH 10. Une démarche similaire à ce qui a été effectuée pour les protéines de blé est présentée. Les mesures de tension de surface et de profil optique sont présentées avec les modèles appropriés à l'interprétation de différentes étapes de forma-

tion. La mesure à temps long permet d'établir et de conforter l'interprétation d'un dernier régime de vieillissement au cours duquel une agrégation protéique, sous la surface est mise en évidence.

Le sixième et dernier chapitre présente une comparaison des études interfaciales des trois protéines d'intérêts, de blé, de tournesol et de colza. Ce chapitre met en relief les différences et invariances obtenues dans la formation de films protéiques et les discute en lien avec la littérature existante.

L'annexe présente la caractérisation d'un lot d'isolat de tournesol plus pur que celui qui a été utilisé pour l'étude interfaciale et volumique. Sa réception tardive n'a pas permis d'effectuer une étude interfaciale. Les propriétés rhéologiques interfaciales d'une goutte d'isolat de tournesol avec échange de volume de solvant à différents pH, sont mesurées. Le lot de tournesol utilisé est le même que celui utilisé pour toutes les études présentées dans ce manuscrit. L'influence de la pureté sur les propriétés interfaciales et volumiques de deux lots d'albumines de colza est présentée.

1. MOTIVATIONS ET ÉTAT DE L'ART

Les protéines ont été nommées ainsi au XIX^{ème} siècle en référence à leurs rôles de première importance dans les êtres vivants (grec : Prôtos). Depuis la découverte de leur propriétés émulsifiantes vers la fin du XIX^{ème} siècle [6], les propriétés fonctionnelles des protéines sont l'objet d'un intérêt particulier pour les communautés scientifiques [7–9]. La complexité des protéines leur confère des propriétés d'hydratation, de texturation et de surface uniques, abordées dans ce chapitre. On se focalise sur les notions permettant de décrire le milieu interfacial liquide/fluide en présence de protéines ainsi que les propriétés fonctionnelles des protéines d'intérêt.

1.1 Les protéines

La protéine est un assemblage d'acides aminés (aussi appelés peptides ou résidus) liés de manière covalente par une liaison peptidique [10] (fig. 1.1). Un acide aminé est composé d'un groupe carboxyle, d'un groupe amine et d'une chaîne latérale qui qui donne sa spécificité à l'acide aminé. Dans le règne animale et végétale, 20 acides aminés sont utilisés par l'être vivant pour la synthèse des protéines (fig. 1.2). Les acides aminés sont responsables des différentes interactions inter- et intra-protéiques (fig. 1.3).
La plus forte de ces interactions est le pont disulfure. Cette interaction covalente peut être formée uniquement entre deux cystéines, car seul cet acide aminé contient un groupe sulfhydryle (-SH).
Les interactions électrostatiques surviennent en présence de charge nette. Dans l'eau pure, l'arginine et la lysine sont chargées positivement alors que l'acide glutamique et l'acide aspartique sont chargés négativement. Ce sont les quatre principaux acides aminés liés aux interactions électrostatiques.
L'interaction entre un atome d'hydrogène et l'électron d'un autre atome est le pont hydrogène, faisable par tous les acides aminés.
Les interactions de vander Waals, uniquement liée à la polarité des molécules, sont également faibles par tous les acides aminés. Les acides aminés polaires vont interagir de manière attractive avec l'eau alors que les acides aminés les moins polaires préfèrent interagir avec des régions moins polaires, on parle d'interactions hydrophobes.

La protéine contient plusieurs niveaux d'organisations que l'on décrit par quatre niveaux de structure.

- La structure primaire est l'ordre de successsion des différents acides aminés dans la protéine, déterminé par l'ADN.
- La séquence peptidique formée peut interagir avec elle même [12] par les ponts disulfures, les interactions électrostatiques, les ponts hydrogènes, et les interactions de vander Waals. Ces

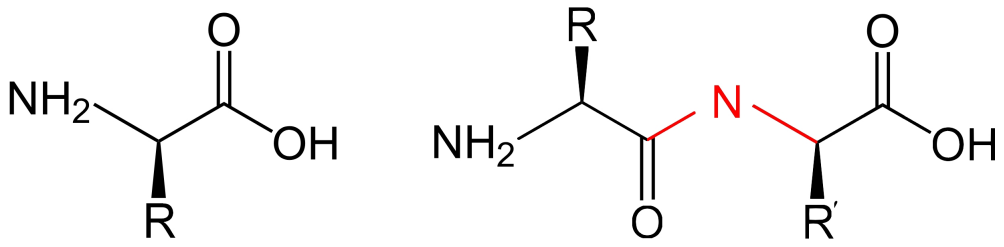


Fig. 1.1: Schéma générique de l'acide aminé et de la liaison peptidique. (Image [10])

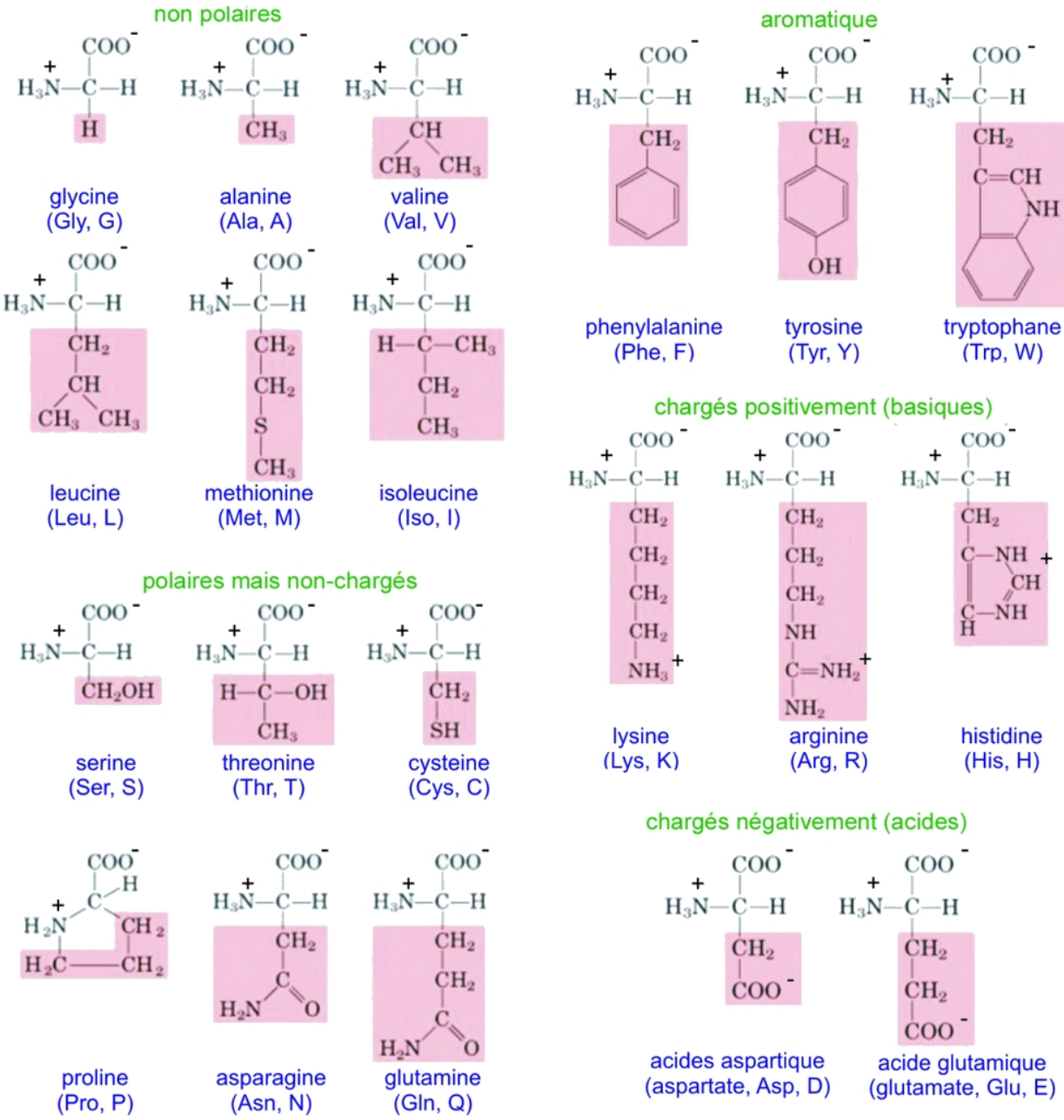


Fig. 1.2: Principaux acides aminés présents dans les protéines. La zone colorée correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé. (Image [11])

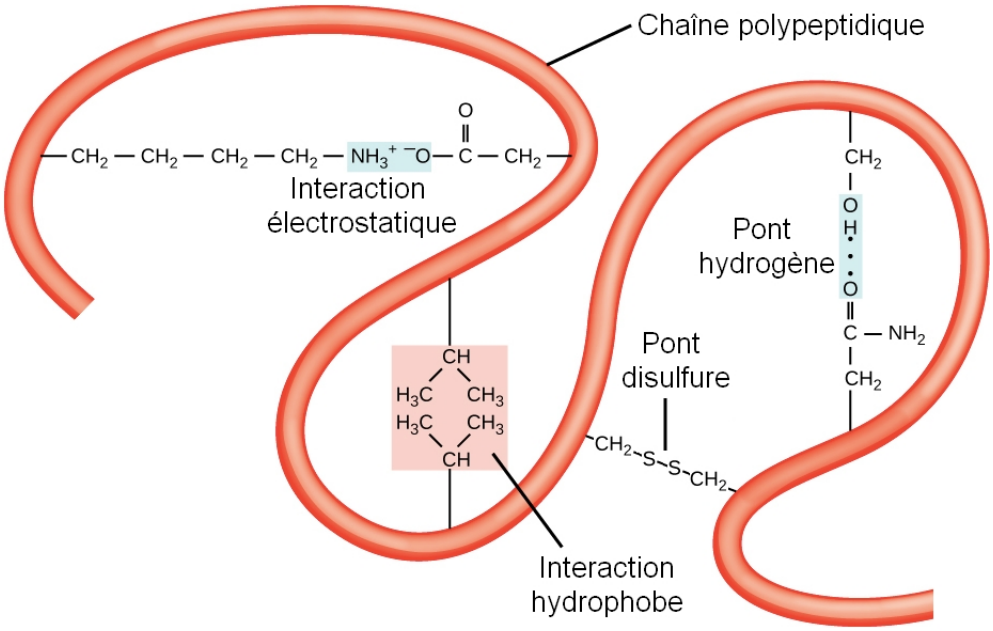


Fig. 1.3: Schéma des interactions intramoléculaires de la séquence peptidique. (Image [11])

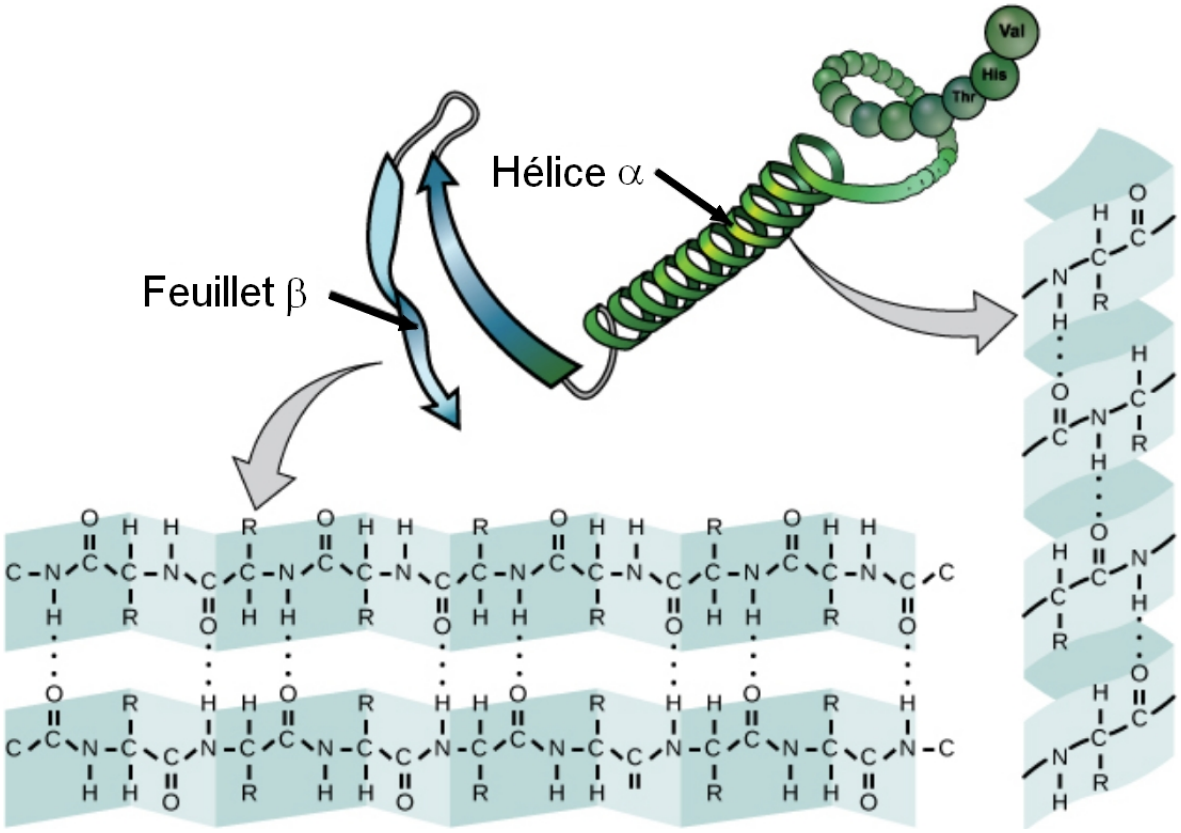


Fig. 1.4: Schéma des hélices α et feuillets β. (Image [11])

interactions intramoléculaires participent à la formation et au maintien de formes prises par la séquence peptidique, comme les hélices α et feuillets β (fig. 1.4). Ces formes constituent la structure secondaire de la protéine. (fig. 1.3.

— L'agencement des hélices et des feuillets dans l'espace constitue la structure tertiaire de la protéine.
— Enfin, lorsqu'une protéine contient plus d'une séquence d'acides aminés, l'agencement des différentes séquences entre elles forment la structure quaternaire [13].

Les protéines ont été classées de différentes manières complémentaires. T. Osborne [14] les a classés selon le solvant dans lequel les protéines se solubilisent au maximum. Il nomme donc les albumines, principalement solubles dans l'eau pure, les globulines, majoritairement solubles dans l'eau salée, les prolamines préférant un mélange eau/alcool et les glutélines, solubles dans l'eau acide ou basique. Une précision dans ce classement a pu être effectué grâce à la méthode d'ultracentrifugation développée par T. Svedberg. Dans une solution protéique, l'accélération provoquée par l'ultracentrifugation (jusqu'à $10^6 \times$g, g : accélération de la pesanteur) donne une vitesse de sédimentation à la protéine dépendant de la masse, de la densité et de la forme de la protéine [15]. Le rapport de cette vitesse de sédimentation sur l'accélération due à la centrifugeuse permet d'estimer un coefficient de sédimentation aux protéines dont l'unité est le Svedberg (S). Cela permet de distinguer différents types de gobulines comme les globulines 11S et les globulines 7S.

Les différents acides aminés confèrent à la protéine des régions plus hydrophiles et d'autres régions plus hydrophobes. Les régions hydrophiles préfèrent le contact de l'eau alors que les régions hydrophobes vont préférer maximiser leur contact avec des zones moins polaires comme les autres régions hydrophobes des protéines, la phase gazeuse, une phase liquide apolaire. Les protéines sont donc des composés amphiphiles complexes par leur conformation et la pluralité de leurs régions hydrophiles et hydrophobes. En présence d'une interface elles peuvent s'y adsorber jusqu'à former un film protéique séparant les deux milieux non miscibles.

1.2 L'interface

Deux phases coexistent lorsqu'elles sont séparées de manière stable par une interface. Le milieu interfacial peut être caractérisé par son énergie libre de surface F_S, lié à la formation d'une interface d'aire A [16] :

$$F_S = \frac{\partial F}{\partial A} = \gamma A \tag{1.1}$$

Où F est l'énergie libre du système et γ la tension de surface.
Plus concrètement, la tension de surface peut être perçue comme une force par unité de longueur et par définition, les forces interfaciales sont parallèles à l'interface. Dans l'expérience de Dupré, un film de liquide suspendu (liquide savonneux) est formé dans un support dont l'un des côtés est mobile. Une force de traction $\overrightarrow{T}$ doit être exercée pour augmenter la surface du film. Lorsque le bord mobile est déplacé d'une distance dl, l'interface des deux côtés du film augmente. Le travail δW de

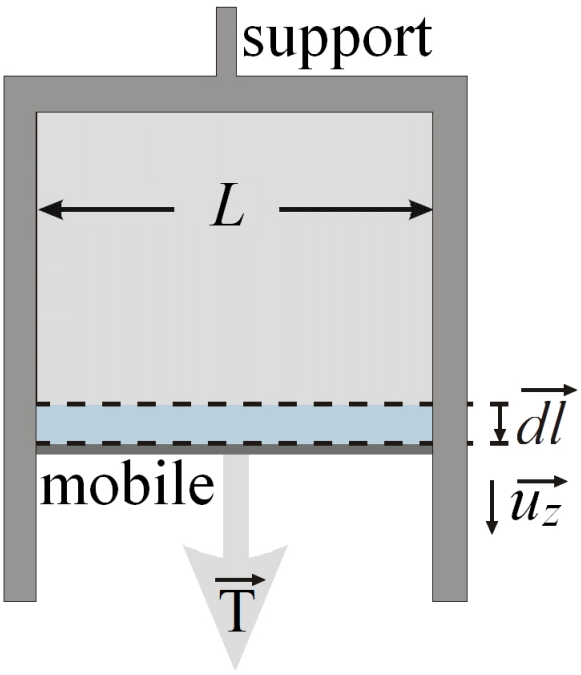


Fig. 1.5: Schéma de l'expérience de Dupré. (Image [17])

la force de traction $\overrightarrow{T}$ nécessaire pour étirer le film d'une longueur dl s'écrit :

$$\delta W = \overrightarrow{T}.\overrightarrow{dl} \tag{1.2}$$

$$\gamma dA = T dl \tag{1.3}$$

Avec $dA = 2L\ dl$ on obtient :

$$T = 2\gamma L \tag{1.4}$$

La tension de surface est donc indifféremment définie comme une énergie par unité de surface ou une force par unité de longueur.
Lorsque qu'un composé amphiphile est adsorbé à l'interface, on définit la pression de surface Π de la façon suivante :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \tag{1.5}$$

Où γ_0 est la tension de surface entre le fluide α et β sans composé amphiphile et γ la tension de surface de la solution en présence de composés amphiphiles.

L'interface séparant le fluide α et le fluide β est d'épaisseur non nulle et correspond à la région où les gradients de concentrations des deux fluides sont non nuls. Mathématiquement, l'interface de Gibbs est modéliser par un plan où la concentration du fluide α surestimé (Aire 1, fig. 1.6 (a)) au voisinage de l'interface du côté du fluide α est égale à la concentration du fluide α sous estimé (Aire

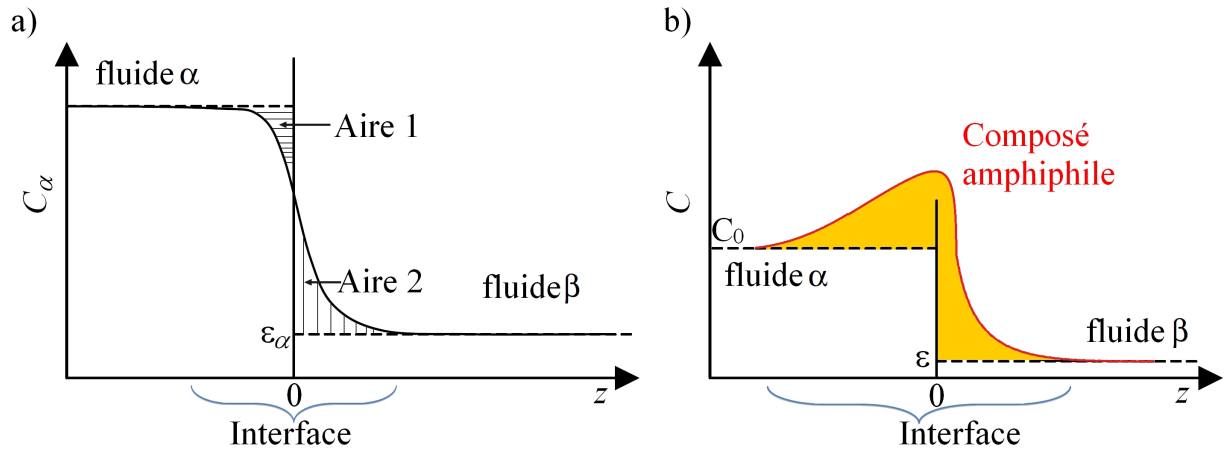


Fig. 1.6: a) Concentration du fluide α de part et d'autre de l'interface avec le fluide β, ε_α correspond à la faible concentration de fluide α solubilisé dans le fluide β.
b) Concentration d'un composé amphiphile solubilisé dans le fluide α, C_0 correspond à la concentration en volume où le gradient de concentration est nul, ε correspond à la faible concentration du composé amphiphile solubilisé dans le fluide β. La zone colorée correspond à la concentration superficielle d'excès.

2, fig. 1.6 (a)) au voisinage de l'interface du côté du fluide β, c'est à dire que l'aire 1 est égale à l'aire 2.

La figure 1.6 (a) montre la concentration du fluide α en fonction de la distance z, $z = 0$ correspond à l'interface, $z < 0$ correspond à la phase α et $z > 0$ correspond à la phase β et ε_α, à la faible concentration de fluide α solubilisé dans le fluide β.
La figure 1.6 (b) montre la concentration d'un composé amphiphile solubilisé dans la phase α en fonction de la distance z, ε correspond à la faible concentration du composé amphiphile solubilisé dans le fluide β. La quantité de composés amphiphiles adsorbés à l'interface est définie par la concentration superficielle d'excès Γ de la façon suivante :

$$\Gamma = \int_{-\infty}^{0} (C(z) - C_0)\mathrm{d}z + \int_{0}^{+\infty} (C(z) - \varepsilon)\,\mathrm{d}z \tag{1.6}$$

Où $C(z)$ est la concentration du composé en volume en fonction de la distance z (fig. 1.6 (b)), C_∞ est la concentration en volume où le gradient de concentration est nul.

1.2.1 Equation d'état, isotherme d'adsorption

L'équation d'état de l'interface rend compte de l'état d'équilibre du film interfacial, elle s'exprime par la relation entre la tension de surface et la concentration superficielle d'excès du composé adsorbé à l'interface [18]. La loi des gaz parfaits en volume est également valable à l'interface :

$$P = CRT \tag{1.7}$$

Où P est la pression du gaz, $C = \frac{n}{V}$ la concentration du gaz par unité de volume, R la constante des gaz parfaits et T la température. A l'interface, la loi des gaz parfaits devient :

$$\Pi = \Gamma RT \tag{1.8}$$

Où Π est la pression de surface et Γ la concentration superficielle d'excès.
Cependant, cette loi n'est valable qu'à très faible pression de surface et lorsque la quantité de composé qui s'adsorbe est très grande devant la quantité de composé qui se désorbe. En effet, pour les composés adsorbés réversiblement la concentration superficielle d'excès à l'équilibre est liée à la concentration en volume. La relation entre Γ et C s'exprime par un isotherme d'adsorption. L'isotherme de Gibbs pour l'ensemeble des composés adsorbés s'écrit de la façon suivante [16] :

$$-\mathrm{d}\gamma = \sum \Gamma_i \mathrm{d}\mu_i \tag{1.9}$$

Où Γ_i est la concentration superficielle d'excès et μ_i le potentiel chimique du composé i. La variation du potentiel chimique du composé i est liée à la concentration en volume par l'équation suivante :

$$\mathrm{d}\mu_i = RT\,\mathrm{d}\ln C_i \tag{1.10}$$

En utilisant les équations 1.9 et 1.10 on obtient, pour le composé i, l'isotherme de Gibbs :

$$\Gamma_i = -\frac{1}{RT}\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}\ln C_i} \tag{1.11}$$

Dans le cas des protéines, I. Langmuir souligne la très faible solubilité des films protéiques étalés à l'interface air/eau et l'improbabilité d'un équilibre adsorption/désorption pour les protéines [19]. Cela remet en cause l'isotherme d'adsorption à l'équilibre adsorption/désorption de Gibbs pour les protéines [6]. Afin d'établir un isotherme qui rende compte de la relation entre C et Γ pour les composés amphiphile adsorbés irréversiblement comme les protéines, c'est à dire sans désorption possible, il faut établir l'évolution des dynamiques d'adsorption à l'interface.

1.2.2 Dynamique d'adsorption

On peut décrire l'adsorption d'un composé amphiphile solubilisé dans un liquide à une interface fluide comme résultant de deux mécanismes :

— Le transport du composé amphiphile jusqu'à l'interface.

— La réaction d'adsorption à l'interface.

Un premier cas limite consiste à considérer que le transport du composé amphiphile vers l'interface est largement plus rapide que l'adsorption du composé à l'interface. L'adsorption du composé est donc limitée par la réaction d'adsorption. La réaction d'adsorption peut s'écrire de la manière suivante pour un composé amphiphile en volume $\mathscr{P}$, qui s'adsorbe irréversiblement $\mathscr{P}_{ads}$ avec la

constante d'adsorption k_a :

$$\mathscr{P} \xrightarrow{\mathrm{k}_a} \mathscr{P}_{ads} \tag{1.12}$$

On définit $\Gamma(t)$ la concentration superficielle d'excès en fonction du temps t, Γ_m la concentration superficielle d'excès à saturation de la monocouche interfaciale. L'isotherme de Langmuir prend en compte la saturation de la monocouche interfaciale dans la cinétique d'adsorption. L'isotherme de Langmuir s'écrit de la manière suivante [20–22] :

$$\frac{\mathrm{d}\Gamma(t)}{\mathrm{d}t} = k_a C \Gamma_m \left(1 - \frac{\Gamma(t)}{\Gamma_m}\right) \tag{1.13}$$

Où C est la concentration volumique du composé amphiphile et t le temps. Dans cet isotherme, l'espace occupé par le composé adsorbé est identique selon qu'il soit voisin ou non d'un composé déjà adsorbé, la fraction de surface occupée par les composés amphiphiles est $\frac{\Gamma(t)}{\Gamma_m}$. Les composés adsorbés sont considérés fixes à l'interface donc la fraction d'espace libre est $1 - \frac{\Gamma(t)}{\Gamma_m}$.
La résolution de l'équation différentielle en prenant les conditions limites à temps court $\lim_{t\to 0}\Gamma(t) = 0$ et à temps long $\lim_{t\to\infty}\Gamma(t) = \Gamma_m$ s'écrit :

$$\Gamma(t) = \Gamma_m(1 - \exp^{-k_a C t}) \tag{1.14}$$

Si à l'inverse, on considère que la réaction d'adsorption est largement plus rapide que le transport des composés amphiphiles à l'interface, l'adsorption est limitée par le mécanisme de transport. Lorsque le mécanisme de transport limitant est la diffusion des composés amphiphiles, la concentration superficielle d'excès en fonction du temps s'écrit de la manière suivante [23] :

$$\Gamma(t) = 2C\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \tag{1.15}$$

Où D est le coefficient de diffusion des composés amphiphiles en solution.

Lorsque l'on considère l'adsorption des composés amphiphiles limitées par la diffusion (eq. 1.15) et la saturation monocouche de l'interface (1.14), la concentration superficielle d'excès peut alors s'écrire de la façon suivante [22] :

$$\Gamma(t) = \Gamma_m \left(1 - \exp\left[-\frac{2C}{\Gamma_m}\sqrt{\frac{Dt}{\pi}}\right]\right) \tag{1.16}$$

Pour l'étude des phénomènes d'adsorption, les protéines ont l'avantage d'être adsorbées irréversiblement, contrairement aux tensioactifs moléculaires où les réactions d'adsorption et de désorption ne sont pas dissociables car l'énergie de désorption est de l'ordre de grandeur de l'agitation thermique. De plus, le coefficient de diffusion des protéines, plus bas que celui des tensioactifs moléculaires, a rendu possible la confrontation du modèle diffusif simple (eq. 1.15) avec les mesures expérimentales. Il existe un temps, le temps de latence, pour lequel la pression de surface devient détectable et marque la fin du régime gazeux. La prédiction de ce temps par le modèle diffusif est (eq. 1.15) :

$$t_{l_1} = \frac{\pi}{D}\left(\frac{\Gamma_{l_1}}{2C}\right)^2 \tag{1.17}$$

Où t_{l_1} est le temps de latence et Γ_{l_1} la concentration superficielle d'excès latente.

Ce temps a été détecté expérimentalement pour une solution protéique d'albumines de sérum bovin (BSA) et comparé au temps prédit par le modèle diffusif. En déposant un film de Langmuir d'une solution de concentration connue de BSA (propanol :eau,BSA, acétate de sodium), F. MacRtichie a évalué $\Gamma_{l_1} = 0.7$ mg/m^2 pour atteindre une pression de surface Π de 0.1 mN/m. Il ensuite mesuré le temps nécessaire à l'augmentation de Π de 0.1 mN/m pour des solutions de BSA de concentrations variables, dans l'eau distillée uniquement. Le temps nécessaire à l'augmentation de pression de surface de 0.1 mN/m à différentes concentrations de BSA en volume est comparée au modèle diffusif (fig. 1.7 (a)). Les temps nécessaires aux augmentations de pression de surface plus élevées ont également été mesurés et comparés au modèle diffusif (fig. 1.7 (b)) [24]. F. MacRitchie constate que pour

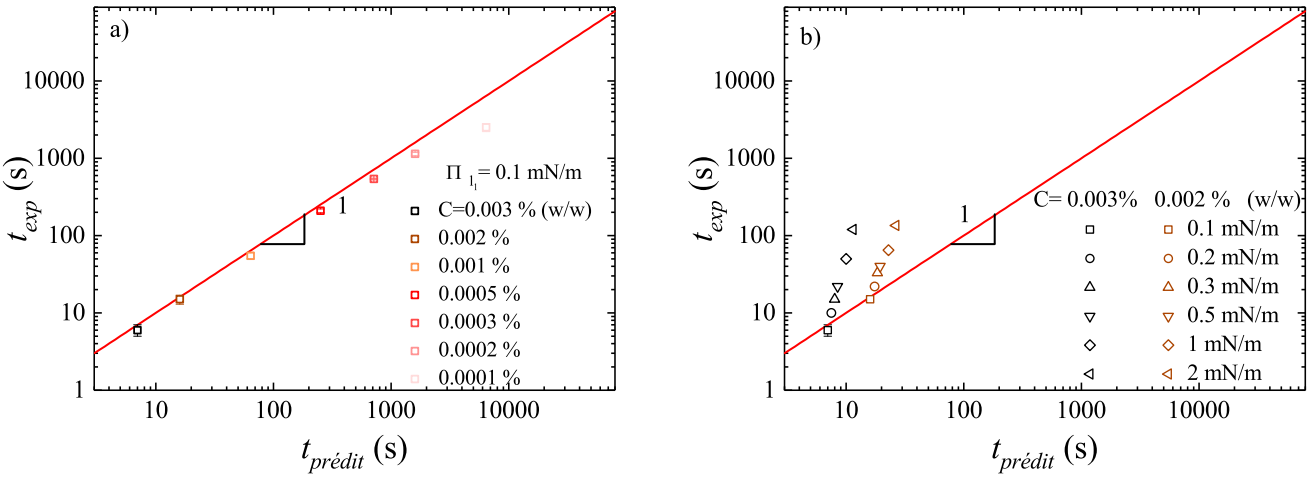


Fig. 1.7: Temps de latence mesuré en fonction du temps de latence prédit par le modèle diffusif pour une solution de BSA. (a) Les carrés vides correspondent aux détections des temps de latences à $\Pi = 0.1$ mN/m. (b) Les différents symboles correspondent aux détections des temps de latences pour $\Pi = 0.1$ à 2 mN/m avec des concentrations $C = 0.002$ % et $C = 0.003$ %. (Résulats des tableaux I et II [24])

atteindre une pression de surface à 0.1 mN/m les temps de latence mesurés sont légèrement inférieurs

au modèle diffusif et d'autant plus inférieurs que la concentration en volume est faible et que le temps prédit est long. L'écart est attribué à de la convection en volume ou à la contamination de l'interface. L'écart entre les temps de latences expérimentaux et prédits sont d'autant plus supérieurs au modèle diffusif que les pressions de surface de détection sont élevées. Il attribue cet effet à la présence d'une barrière d'adsorption liée au remplissage de l'interface. L'écart au modèle diffusif a par la suite été modélisé par un coefficient de diffusion apparant [25], lié au coefficient de diffusion des composés en solution, limité par barrière d'adsorption du type loi d'Arrhenius :

$$D_a = D.e^{\left(\frac{-2\varepsilon_a}{RT}\right)} \tag{1.18}$$

Avec ε_a l'énergie d'activation de la réaction d'adsorption, R la constante des gaz parfaits et T la température.

Grâce à l'évolution des techniques de mesures de pression de surface, les mesures des temps de latence plus précis ont pu être effectuées. La figure 1.8 montre l'évolution des temps de latence en fonction de la concentration d'une solution de BSA. La dépendance en loi de puissance d'exposant C^{-2} indique un processus limité par la diffusion alors que la dépendance en loi de puissance C^{-1} indique un processus limité par la convection. [26] C. Ybert et al. ont proposé que le passage de la limitation par la convection à la limitation par la diffusion est lié une longueur caractéristique δ. Lorsque les protéines à une distance de l'interface supérieur à δ sont requises pour atteindre Γ_{l_1} l'adsorption devient dominée par la diffusion. Cette longueur est liée à la convection libre par le coefficient de transfert de masse $k = \dfrac{D}{\delta}$. Le meilleur ajustement donne $\delta = 0.2$ mm et la modélisation de cette distance par les transports de convection libres liés aux heterogénéités de température et aux dimensions de la cellule donne $\delta = 0.4$ mm ce qui est en accord avec les mesures expérimentales.

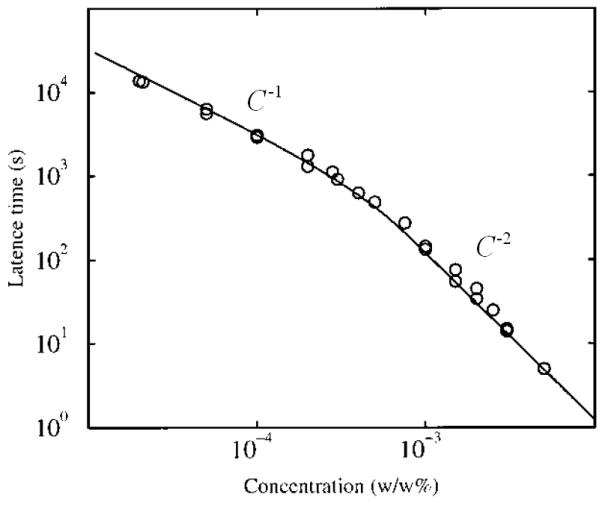


Fig. 1.8: Temps de latence en fonction de la concentration de BSA en solution. Mesures expérimentales (ronds vides) et prédictions (traits) diffusives en loi de puissance C^{-2} et convectives en loi de puissance C^{-1}. (Image [26])

Les mécanismes limitant l'adsorption des protéines lorsque l'interface est modélisable par la loi des gaz parfait sont donc la convection pour des concentrations en volume suffisamment faibles, puis la diffusion des protéines à l'interface.
A la limite du régime gaz parfait, lorsque les protéines sont en monocouche et commencent à intéragir, il est possible d'évaluer la masse molaire des protéines par la loi des gaz parfaits en connaissant la quantité déposée à l'interface et l'évolution de Π en fonction de l'aire interfaciale [27, 28]. A partir des valeurs de pressions de surface autour de 1 mN/m, les protéines n'obéissent plus à la loi des gaz parfaits et la modélisation thermodynamique devient dépendante de nombreux paramètres. V. B Fainerman, E. H Lucassen-Reynders et R. Miller ont proposé une équation d'état avec un isotherme d'adsorption pour les films protéique [29, 30]. Les paramètres ajustables de l'équation d'état sont, les aires de surface minimales et maximales de la protéine, le nombre d'état de la protéine adsorbée, le coefficient d'activité de surface de chaque état évoluant en loi de puissance α où α est aussi un paramètre libre du modèle, la pression de surface lors de la saturation de la monocouche, l'agrégation sous la première couche interfaciale et un coefficient d'interaction électrostatique, entre autres. Dans ce modèle, sur dix paramètres ajustables, cinq sont trouvés par des mesures indépendantes. Il faut donc effectuer plusieurs expérimentations sur le système avant de pouvoir prédire son évolution avec la concentration en volume. La complexité de ce modèle, la quantité de paramètres libres et ceux obtenus par des expériences annexes nous ont conduit à interpréter d'autres mesures comme la concentration superficielle d'excès en fonction du temps à différentes concentrations de composés amphiphiles en volume. Grâce à des techniques comme l'ellipsométrie, on peut mesurer le profil optique du film de manière non invasive et modéliser la concentration superficielle d'excès d'un composé adsorbé à l'interface avec le temps. La figure 1.9 montre la concentration superficielle d'excès, d'une solution de BSA à 3 μM dans un solvant tampon phosphate en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) à des concentrations en volume variables, en fonction du temps. Sans ajout de SDS et avec ajout de SDS donnant une concentration à 0.001 mM, la concentration superficielle Γ augmente rapidement jusque 1.4 mg/m^2 puis atteint une asymptote avec le temps à 1.5 mg/m^2. A partir d'une concentration de SDS à 0.003 mM, Γ augmente beaucoup plus lentement sans atteindre d'asymptote sur 10 h de mesure. Cela est attribué à l'interaction BSA/SDS sur la surface de la BSA qui augmente la charge nette du complexe. La barrière d'adsorption est alors significativement plus haute [31]. Pour une concentration en SDS à 0.3 mM, Γ augmente d'abord plus lentement à cause d'une charge nette du complexe plus grande. Ensuite Γ devient plus élevé que la valeur de saturation trouvée sans ajout de SDS. Cela est attribué à une perte de la structure tertiaire des protéines qui vont donc favoriser l'étalement à l'interface. A la concentration micellaire critique du SDS (10 mM), le SDS en excès est adsorbé et empêche l'adsorption des protéines complexés au SDS, cette courbe est montré à titre de comparaison mais la valeur absolu ne correspond pas à la quantité de SDS adsorbé à l'interface.

En plus d'interactions entre composé amphiphiles que l'on peut considérer comme des impuretés dans le cas d'isolat protéiques, de nombreux effets limitant l'adsorption ont été mis en évidence

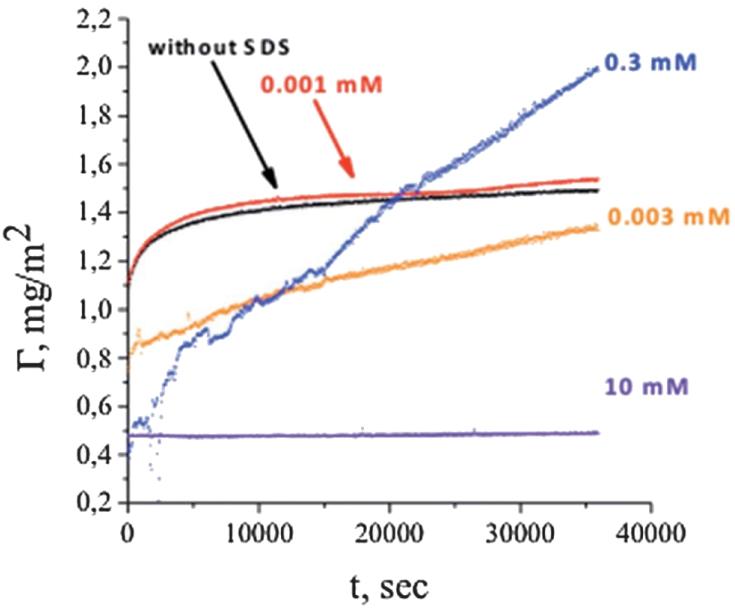


Fig. 1.9: Concentration superficielle d'excès avec le temps d'une solution de BSA à 3 μM dans un solvant tampon phosphate (pH 6.7 $I = 2$ mM) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) à des concentrations en volume variables. (Image [31])

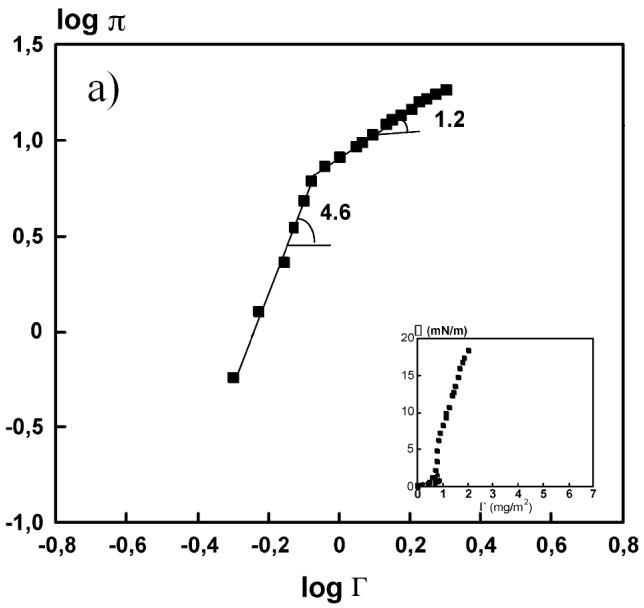
comme les interactions électrostatiques [32], l'influence de la conformation des protéines à l'interface et le changement de conformation lors de l'adsorption [33, 34].
Les différentes interactions lors de l'adsorption des protéines avec le film déjà formé et les différentes interactions latérales inter et intra-protéiques complexifient significativement la modélisation des dynamiques d'adsorption. Devant la complexité du problème d'adsorption pour des pressions de surface non nulles, on peut distinguer différents types d'études courantes dans la littérature :

- Modélisation de l'équation d'état $\Pi = f(\Gamma)$ [29, 30, 35].
- Apports de résultats ciblés sur la strucutre du film protéique [36–38]
- Apports de résultats sur la formation du film protéique dans une large gamme pression de surface [39–42]

Les études interfaciales présentées dans les chapitres suivants de ce manuscrit se situent dans le dernier type d'études listées.

1.2.3 Structuration du film protéique

Par les théories issues de la modélisation de l'adsorption de polymères multiblocs asymétriques, on peut modéliser des conformations étalées ou repliées au niveau de l'interface (modélisation 2D) et des segments de polymères en dehors de l'interface (modélisation 3D) vient de théories issues de la modélisation de l'adsorption polymères multiblocs asymétriques [43, 44]. La modélisation de l'équation d'état par une loi de puissance $\Pi \propto \Gamma^y$ permet d'évaluer la nature du solvant vu par le composé adsorbé, d'après la valeur de y. Les valeurs données dans le tableau 1.10 (b) correspondent à la modélisation des interactions du composé adsorbé avec le solvant. La considération d'abord en 2D (y_2) est effectuée pour les plus basses pressions de surface, pui en 3D (y_3) pour les pressions



b)

Conditions	$y2$	$y3$
Extended chain	2	3/2
Good solvent	3	9/4
θ solvent	8	3
Poor solvent	∞	∞

Fig. 1.10: a) Mesure de l'équation d'état à l'interface air/eau d'une solution tampon de β-caséine à la force ionique $I = 0.23$ mM. (Image [44])
b) Tableau des exposants théoriques en considérant les interactions du composé adsorbé en 2D ou en 3D, en régime semi dilué. (Image [45])

de surface plus haute [45]. La figure 1.10 (a) montre les mesures expérimentales de la pression de surface en fonction de la concentration superficielle d'excès à l'interface air/eau d'une solution tampon de β-caséine à la force ionique $I = 0.23$ mM. L'augmentation de $\Pi = f(\Gamma)$ correspond à une loi de puissance $y_2 = 4.6$ puis $y_3 = 1.2$. D'après la modélisation par l'approche polymère, les blocs hydrophiles forment des boucles 3D dans l'eau, c'est pourquoi le facteur $y_2 = 4.6$ à basse pression de surface indique que les segments de β-caséine adsorbés voient le solvant comme en bon solvant et en solvant θ. A plus haute pression de surface, le $y_3 = 1.2$ est interprété comme une formation quasi-brosse des blocs hydrophiles dans l'eau [44].

La structure du film protéique peut également être étudiée grâce à des techniques optiques comme l'éllipsométrie [46, 47], la spectrométrie infrarouge [48], la réflexion de neutrons [49, 50] ou bien la réflexion des rayons X comme on peut le voir pour l'article [51].
Dans cet article, par réflexion des rayons X, Y. F. Yano et al. ont comparé les profils de la densité électronique à l'interface air/eau de différentes protéines et les ont comparés aux profils modélisés pour des protéines non dénaturées.
La figure 1.11 montre les profils de densité électronique expérimentaux et la modélisation des protéines non dénaturées. Les travaux mettent en évidence la destructuration, c'est à dire lle changement de conformation des protéines aux interfaces. La comparaison des profils montrent que la myoglobine apparaît moins dénaturée lors de l'adsorption interfaciale que la BSA et le lysozyme. Par ailleurs, il a été montré que l'énergie de compression par acides aminés de la BSA est cinq fois plus grande que pour la myoglobine [52]. La rigidité de la protéine n'est donc pas la contribution principale limitant le changement de conformation lors de l'adsorption. D'après Y. F. Yano et al. la dénaturation

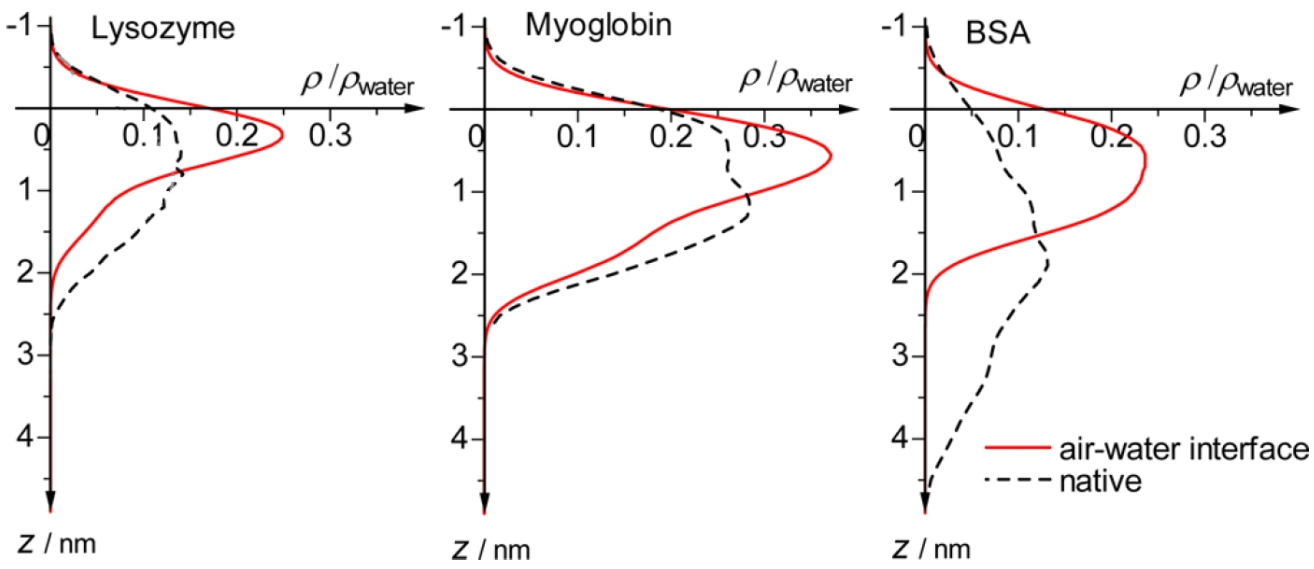


Fig. 1.11: Comparaison des profils de densité électronique expérimentaux (lignes pleines) après 10 - 14 s de l'injection de solutions protéiques avec le profil simulé des protéines non dénaturées (lignes hachurés). (Image [51])

interfaciale a lieu si la cinétique d'adsorption est similaire ou inférieure à la cinétique de dénaturation.

La formation de films protéiques de β-caséine et de lysozyme aux interfaces air/eau (a/e) et huile/eau (h/e) a été étudiée par D.E. Graham et M.C Phillips [53] qui mesurent la pression de surface par plaque de Wilhelmy et la concentration superficielle d'excès par radiotraceur au ^{14}C et ellipsométrie. Les résultats de pression de surface et de concentration superficielle d'excès à l'état de quasi équilibre sont combinés pour obtenir les isothermes de pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excès.
La figure 1.12 montre la pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excès de la β-caséine pour une pression de surface en quasi-équilibre (ronds pleins) et durant l'adsorption (triangles vides) à l'interface air/eau. Les mesures sont aussi effectuées à l'interface h/e à l'état de quasi équilibre de la pression de surface avec le temps (ronds vides) [53]. Aux interfaces a/e et h/e, la pression de surface augmente avec la diminution d'aire par masse de protéines jusqu'à un plateau autour de 23 mN/m.
L'aire produisant une augmentation visible de la pression de surface est plus élevée à l'interface a/e ($A > 2.2$ m^2/mg) qu'à l'interface h/e ($1.3 < A < 2.0$ m^2/mg). Cela suggère un meilleur étalement de la β-caséine à l'interface air/eau qu'à l'interface huile/eau. D.E. Graham et M.C Phillips proposent qu'à l'interface h/e, certaines régions de la β-caséine partent dans l'huile plutôt que de rester adsorbée à l'interface comme c'est le cas à l'interface a/e. De plus, la comparaison entre les mesures à l'interface air/eau à temps long (ronds pleins) et durant l'adsorption (triangles vides) montrent que pour une pression de surface donnée la concentration superficielle d'excès est la même. La relation entre la pression de surface et la concentration superficielle d'excès ne dépend donc pas du temps. La figure 1.13 montre la pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excès

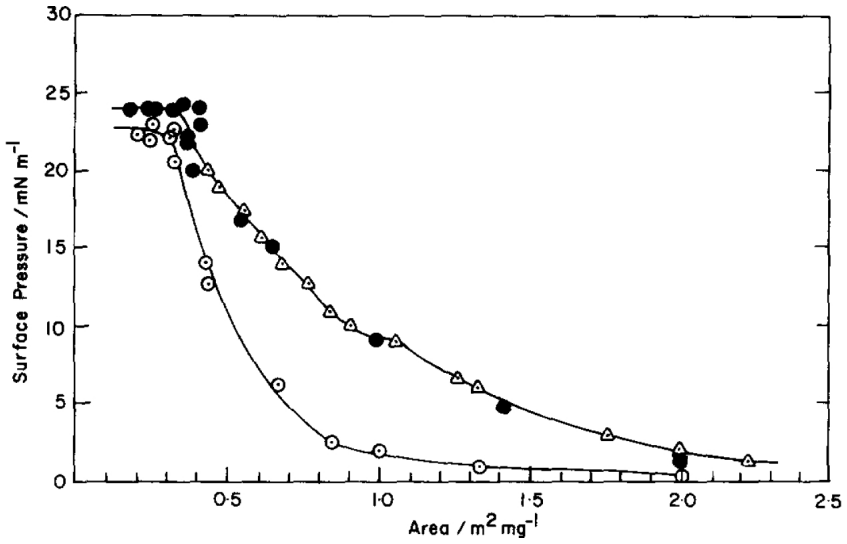


Fig. 1.12: Pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excès de la β-caséine pour une pression de surface en quasi-équilibre (ronds pleins), durant l'adsorption (triangles vides) à l'interface air/eau et à l'interface h/e à l'état de quasi équilibre de la pression de surface avec le temps (ronds vides). (Image [53])

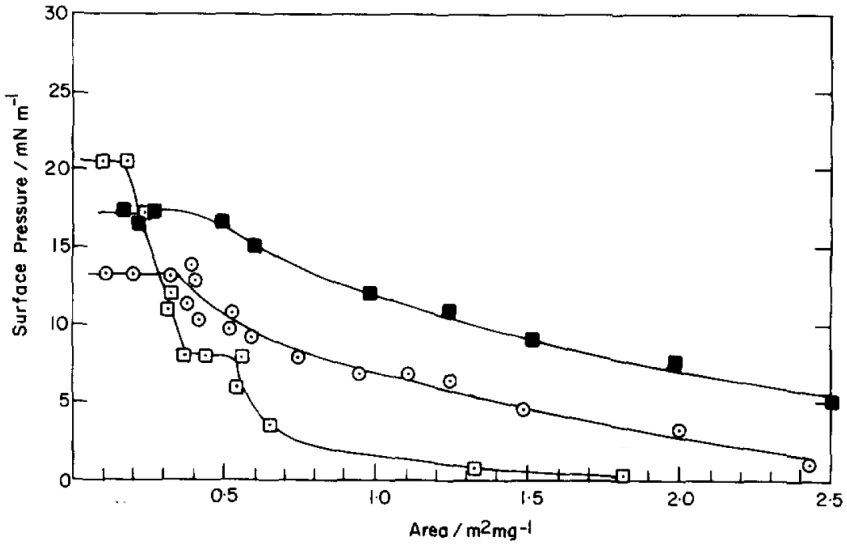


Fig. 1.13: Pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excèss du lysozyme non dénaturé (pH 7, carrés vides), dénaturé (pH 1, à 50°C, ronds vides) à l'interface air/eau, et non dénaturé à l'interface huile/eau (carrés pleins). (Image [53])

du lysozyme non dénaturé (pH 7, carrés vides), dénaturé (pH 1, à 50°C, ronds vides) à l'interface a/e, et non dénaturé à l'interface h/e (carrés pleins). Pour le lysozyme non dénaturé, à l'interface a/e, la pression de surface augmente avec la diminution d'aire par masse de protéine jusqu'à un premier plateau à 8 mN/m puis un deuxième plateau à 20 mN/m. Pour le lysozyme dénaturé, à l'interface a/e, la pression de surface augmente avec la diminution d'aire jusqu'à un unique plateau à 14 mN/m. Pour le lysozyme non dénaturé, à l'interface h/e, la pression de surface augmente jusqu'à un plateau à 17 mN/m.

L'aire nécessaire à l'augmentation visible de la pression de surface est plus élevée à l'interface h/e ($Aire > 2.5$ m^2/mg) qu'à l'interface a/e ($Aire = 1.3$ m^2/mg). Cela suggère un plus large étalement du lysozyme à l'interface h/e. D.E. Graham et M.C Phillips proposent qu'à l'interface h/e, l'étalement est plus grand car l'huile favorise plus le déploiement des zones hydrophobes que l'air. De plus, à l'interface a/e, à l'inverse du lysozyme natif, le lysozyme préalablement dénaturé ne montre pas de plateau à 8 mN/m. Ce plateau est donc attribué à une dénaturation des lysozymes dans le film.

Les propriétés rhéologiques des films protéiques découlent de la structure interfaciale et peuvent donc apporter des informations de structures interfaciales.

1.2.4 Rhéologie interfaciale

On peut sonder ses propriétés viscoélastiques par rhéologie dilatationnelle [54] ou de cisaillement [55]. Pour sonder les propriétés dilatationnelle interfaciales, on peut imposer une variation de surface sinusoïdale et mesurer la tension interfaciale résultante :

$$A(t) = A_0 \exp^{i(\omega t)} \tag{1.19}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \exp^{i(\omega t + \varphi)} \tag{1.20}$$

Où A_0 et γ_0 sont les surfaces et les tensions de surface moyennes pendant l'oscillation, ω la pulsation et φ le déphasage entre l'oscillation de surface imposée et la tension de surface mesurée. Les modules élastiques et visqueux s'écrivent de la manière suivante [43] :

$$E' = \parallel E^*(\omega) \parallel \cos\varphi = \frac{d\gamma}{d\ln A} \tag{1.21}$$

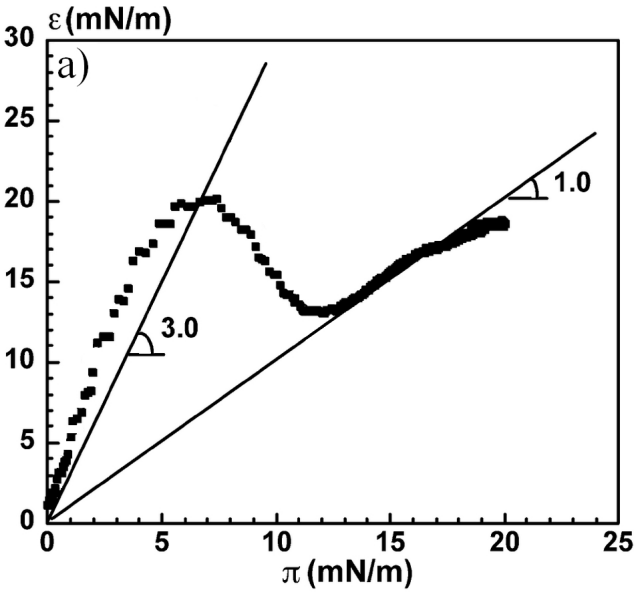
$$E'' = \parallel E^*(\omega) \parallel \sin\varphi = \eta_d \omega \tag{1.22}$$

Où $\parallel E^*(\omega) \parallel$ est la norme du module viscoélastique, η_d la viscosité interfaciale dilatationnelle.

Les mesures de E' peuvent être effectués dans le cas ou les temps d'adsorption et de désorption sont négligeables devant la durée de l'oscillation, la quantité adsorbée à l'interface est donc constante et puisque $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ on peut écrire l'élasticité interfaciale de la façon suivante [56] :

$$E' = \frac{d\Pi}{d\ln\Gamma} \tag{1.23}$$

La modélisation de l'élasticité interfacial d'un film protéique en fonction de la pression de surface peut être effectuée en prenant la dérivée de l'équation d'état donnée par V. B. Fainerman et al. [30, 35, 57]. Le modèle issue des théories de l'adsorption de polymères multiblocs asymétriques



b)

Conditions	$y2$	$y3$
Extended chain	2	3/2
Good solvent	3	9/4
θ solvent	8	3
Poor solvent	∞	∞

Fig. 1.14: a) Module d'élasticité dilatationnelle ε en fonction de la pression de surface à l'interface air/eau d'une solution tampon de β-caséine à la force ionique $I = 0.23$ mM. (Image [44])
b) Tableau des exposants théoriques en considérant les interactions du composé adsorbé en 2D ou en 3D, en régime semi dilué. (Image [45])

prédit également la conformation de la protéine avec la pente du module d'élasticité dilatationnelle en fonction de Π, $E' = y\Pi$ La figure 1.14 montre l'évolution du module élastique à l'interface d'une solution de β-caséine en fonction de la pression de surface. E' augmente avec Π en suivant une pente supérieure à 3. L'élasticité diminue ensuite avec Π jusqu'à $\Pi = 10mN/m$ puis augmente à nouveau avec une pente de 1. Les mesures de l'élasticité dilatationnelle en fonction de la pression de surface d'un film de β-caséine donnent des valeurs de y similaires aux facteurs des lois de puissances modélisant l'équation d'état $\Pi(\Gamma)$ comme le montre les figures 1.10 et 1.14 L'interprétation est donc la même.

La rhéologie interfaciale de cisaillement à été modélisé pour un bicône placé à l'interface entre deux fluides non miscibles [58, 59]. Dans le cas ou la la viscosité en volume η est négligeable devant la viscosité interfacial η_s, le couple M s'écrit :

$$M = 4\pi R_B^2 \eta_s \omega \tag{1.24}$$

Où R_B est le rayon du bicône.
Dans le cas ou la viscosité interfacial η_s est grande devant la viscosité en volume η qui n'est pas négligeable, le couple M s'écrit :

$$M = 4\pi R_B^2 \eta_s \omega + \frac{8}{3} R_B^3 \eta \omega \tag{1.25}$$

La contrainte est liée au couple de la manière suivante :

$$\sigma = \frac{3}{2\Pi R_B^3} M \tag{1.26}$$

Le module de cisaillement interfaciale contient une partie réelle correspondant au module élastique G' et une partie imaginaire, correspondant au module visqueux G'' :

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{avec } G'' = \eta_s \omega \tag{1.27}$$

L'évolution des propriétés rhéologiques du film interfacial permettent d'identifier des évolutions de structures. E. M. Freer et al. ont sondé les propriétés rhéologiques par rhéologie de cisaillement et rhéologie dilatationnelle, à l'interface hexadécane/eau d'une solution de β-caséine et de lysozyme [41]. La mesure de l'élasticité dilatationnelle interfaciale E' par oscillation de la surface contient les contributions statiques et dynamiques de l'élasticité. Pour mesurer la contribution statique, l'interface âgé de 24 h est brusquement comprimée de 2.5 % de l'aire initiale et la tension de surface est enregistrée avec le temps. La soustraction du module total E' par le module d'élasticité statique donne l'élasticité dynamique $\delta E'$ défini par E. M. Freer et al. Le module élastique de cisaillement G' est également mesuré en fonction du temps par une méthode d'aiguille magnétique [60]. L'aiguille est déposée à l'interface hexadécane/eau et un champ magnétique sinusoïdale est imposé. Les mouvements de l'aiguille sont enregistrés par une caméra montée sur un microscope optique. La figure

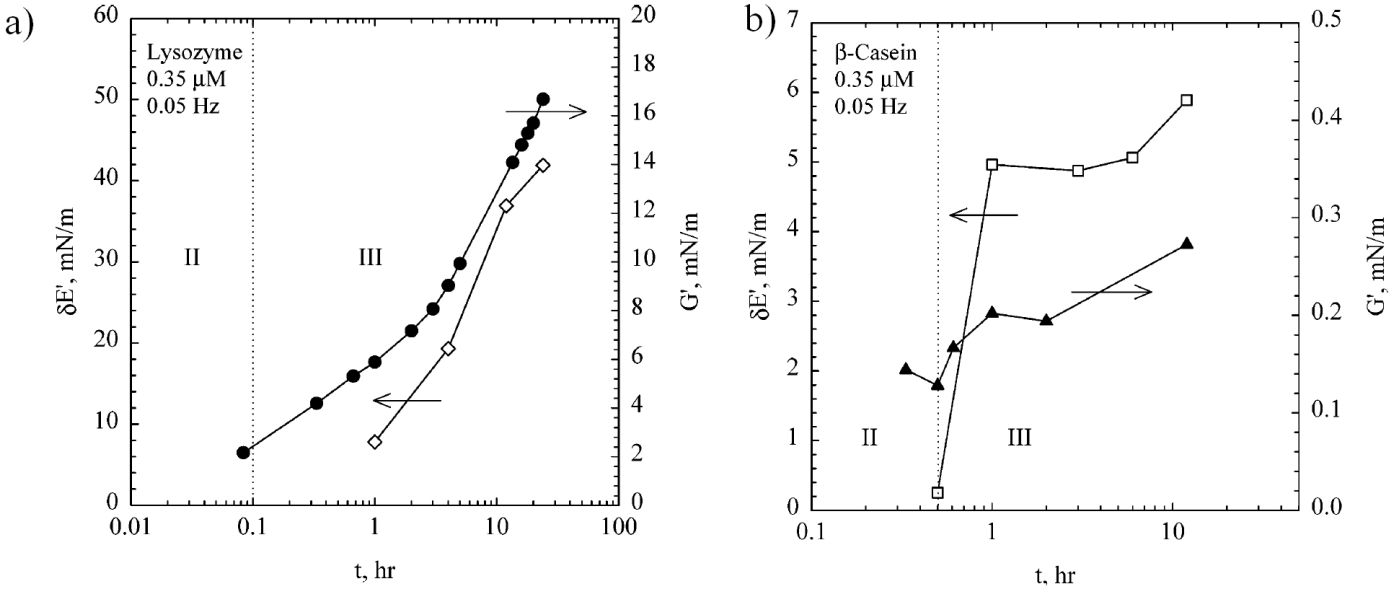


Fig. 1.15: Elasticité dynamique à l'interface hexadecane/eau en fonction du temps et élasticité de cisaillement pour une solution de lysozyme (a) et de β-caséine (b) de concentration en solution de 0.35 μM. (γ =2.5 %, f =0.05 Hz). Les régimes II et III correspondent à la saturation de la monocouche et à la gélification interfaciale (Image [41])

1.15 montre les modules d'élasticité dynamique et d'élasticité de cisaillement en fonction du temps à l'interface hexadécane/eau pour une solution de lysozyme (a) et de β-caséine (b) de concentration 0.35 μM. Les régimes II et III correspondent à la saturation de la monocouche et à la gélifica-

tion interfaciale. Ces régimes sont communément observés pour différentes protéines [39, 61]. Les deux modules $\delta E'$ et G' augmentent avec le temps de manière similaire. Pour le lysozyme, le module d'élasticité dynamique est deux fois plus élevé que le module de cisaillement alors que pour la β-caséine le module d'élasticité dynamique est un ordre de grandeur plus élevé que le module de cisaillement. De plus, Ces modules sont un ordre de grandeur plus élevés pour le lysozyme que pour la β-caséine.
E. M. Freer et al. attribuent l'évolution similaire des modules de cisaillement et d'élasticité dynamique à la formation multicouche pour ces deux protéines durant le régime III. La différence d'un ordre de grandeur des valeurs des modules d'élasticité pour ces deux protéines est attribuée à leur rigidité, bien plus grande pour le lysozyme que pour la β-caséine. Par cette étude, E. M. Freer et al. trouvent que les mesures de cisaillement sont plus sensibles aux interactions inter-protéiques et à l'agrégation alors que les mesures de compression/dilatation sondent d'avantage la flexibilité intrinsèque et l'aptitude aux changements de conformations des protéines en plus des interactions inter-protéiques [41].

L'évolution des propriétés rhéologiques du film protéique et les mesures de l'équation d'état Π =f(Γ) sont un moyen d'évaluer l'évolution de structure du film. D'après E. M. Freer et al. la rhéologie interfaciale de cisaillement donne accès à une évaluation de la structure inter-protéique et peut aider à la distinction d'une structure liquide ou solide viscoélastique alors que la rhéologie dilatationnelle semble d'avantage liée à une évaluation de la flexibilité intrinsèque des protéines adsorbées et prises dans un film protéique. En plus d'apporter des éléments dans la compréhension de la formation des films protéiques, l'élasticité du film est aussi liée à l'écoulement interfacial et donc à la stabilité d'émulsions.
La génération et la stabilité des mousses et émulsions dépendent des propriétés interfaciales induites par les composés amphiphiles comme les protéines. Pendant l'émulsification, l'aptitude stabilisante des protéines n'est pas seulement contenue dans la capacité à réduire la tension de surface mais aussi dans la modification des propriétés d'écoulement à l'interface. Le rôle essentiel de l'émulsifiant est de produire un gradient de tension de surface sous déformation de l'interface, forçant l'écoulement du film interfacial vers la zone déformée. L'élasticité dilatationnelle du film interfacial est une expression de l'amplitude du gradient de tension de surface sous compression/dilatation de l'interface [62, 63].

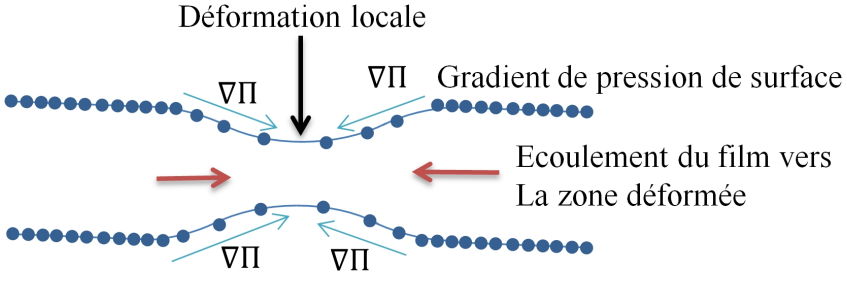


Fig. 1.16: Représentation schématique de l'effet Marangoni lors de la déformation du film interfacial d'une bulle.

L'effet de résistance interfaciale contre le gradient de tension de surface à l'effet Marangoni (fig. 1.16).

1.3 Les Protéines d'intérêt

Les protéines étudiées dans ce manuscrit sont toutes des protéines de réserves. Elles sont présentes dans la graine de la plante et ont pour rôle de constituer une réserve d'acides aminés en vue d'une germination de la graine et la maturation de la plante.

1.3.1 Protéines de réserve du blé

Les prolamines sont une des principales familles de protéines présentes dans le grain de blé [48]. Ces prolamines, riches en acides aminés proline et glutamine [64], sont classées en deux sous catégories, les gliadines, monomériques et les gluténines, polymériques. L'isolat étudié contient principalement des gliadines (84 % w/w). Les gliadines sont classées selon leur mobilité électrophorétique en quatre types, toutes monomériques : les gliadines α, β, γ et ω [65]. D'après les gènes codant pour les gliadines, les gliadines α et β ont des séquences d'acides aminés similaires, on parlera donc des gliadines α/β [66]. Le lot étudié et présenté dans ce manuscrit contient 84 % de gliadines dont 71 % sont des gliadines α/β et 13 % des gliadines ω [67]. Les 16 % restants sont constitués de 9 % de gluténines et 7 % d'albumines et de globulines.

1.3.1.1 Extraction

Les gliadines sont généralement extraites à partir de gluten ou de farine.
Il existe de nombreux protocoles de purification, un protocole à partir de farine et celui à partir de gluten seront décrits.
La farine d'abord mélangée à du chlorure de diméthyle pendant 30 min, à raison de 500 g de farine pour 1 L de solvant. Cela permet de dégraissage de la farine. Le mélange est filtré à travers un entonnoir Büchner. On laisse le solvant s'évaporer pendant 12 h. La farine dégraissée est dispersée dans de l'eau salée à 0.4 M de NaCl pendant 30 min. La dispersion est centrifugée à 6000$\times$ g à 20°C. Le culot est mélangé dans une solution éthanol/eau à 55 % puis centrifugé. Le surnageant contient les gliadines et les gluténines. En laissant le surnageant 12 h à 4°C une séparation liquide/liquide apparaît. Par centrifugation20000 $\times \times$ g pendant 10 min à 2°C les gluténines sont agrégés dans le culot. Le surnagent est enrichi en gliadines. Les gliadines sont récupérées par évaporation du solvant à 35°C la pureté de l'isolat avoisine les 80 % en gliadines, 10 % en gluténines et 10 % en globulines et albumines [68, 69].

Le protocole de purification partant du gluten est celui utilisé pour l'isolat étudié et présenté dans ce manuscrit. La description quantitative est donnée à la section 2.2.2.1. Brièvement, le gluten est

mélangé dans une solution eau/éthanol puis centrifugé. Dans le culot, des impuretés et assemblages protéiques de très haut poids moléculaires sont présents. La phase légère se compose pincipalement de gluténines et de gliadines solubilisées. Par refroidissement de cette phase légère une séparation liquide/liquide a lieu [70] et permet de séparer les gliadines des gluténines dans des proportions contrôlables par la température de trempe .
Les gliadines et gluténines peuvent être ensuite séparées plus ou moins efficacement selon la température de trempe de la solution [71].

1.3.1.2 Structures

Toutes les gliadines sont composées d'une seule séquence peptidique, elles sont donc monomériques. La masse molaire des gliadines α/β et γ est comprise entre 30 et 40 kDa avec un point iso-électrique (pI) de 6.5 à 8.0. La séquence peptidique contient une séquence répété d'acides aminés, hydrophile, et une séquence d'acides aminés non répétée, plus hydrophobe [72]. Des ponts disulfures intramoléculaires sont présents dans la zone non répétée [73]. Les gliadines ω ont une masse molaire comprise entre 60 et 80 kDa avec un pI de 8 [73]. La séquence peptidique des gliadines ω contient un ordre répété d'acides aminés, hydrophile et ne contient pas de ponts disulfures intramoléculaires [66], ce qui les rapproche d'un polymère modèle.
Parce que les gliadines de blé sont pauvres en acides aminés pouvant se ioniser avec le pH (seulement une dizaine par protéine [66]), elles sont insolubles dans l'eau pure. Pour évaluer la charge nette des protéines, les séquences primaire des gliadines α/β (P02863) et γ (P21292) sont récupérées de la base de donnée www.uniprot.org. On considère que les pKa des acides aspartiques et glutamiques ainsi que celui des lysines et arginines sont les mêmes que les pKa de ces acides aminés libres même si en réalité les liaisons peptidiques et la conformation de la protéine contribuent à une plus grande stabilité électronique ce qui donne un pKa des acides aminés ionisables plus élevé. Dans le solvant acétique (pH 3) utilisé pour cette étude, les acides aspartiques et glutamiques sont protonés, la charge nette des gliadines est donc donnée uniquement par les résidus arginine et lysine. Pour les gliadines la charge nette est de +6 à +7. La structure secondaire des gliadines n'est pas stable [74] et varie largement selon l'environnement. Dans un solvant éthanol/eau à 70 % v/v, les gliadines α/β contiennent 33 à 37 % d'hélices α et 11 à 12 % de feuillets β, les gliadines γ contiennent 37 % d'hélices α et 20 à 23 % de feuillets β [66]. La fraction restante de la séquence peptidique n'est pas structurée. les gliadines ω ne sont pas structurées [75]. L'absence de méthode pour cristalliser les gliadines rend difficile l'obtention d'une structure tertiaire. Cependant, dans des solutions acides et alcoolisées, les gliadines sont présentes sous forme ellipsoïdale. La modélisation de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a été effectuée pour différentes fractions de gliadines (fig. 1.17)
Les mesures de SAXS permettent de déterminer le rayon de giration R_g par l'approximation de Guinier, le diamètre d et la longueur L du cylindre modélisant le mieux les mesures ainsi que le grand axe de l'ellipsoïde $2a$ et la longueur maximale L_c de la protéine étirée [66]. Le rayon de giration plus élevé dans le solvant éthanol à 70 % v/v que dans l'acide acétique à 1% (fig. 1.17) montre que

Gliadin molecular parameters derived from SAXS

Protein	Solvent	*Rg* (nm)	d^a (nm)	L^b (nm)	$2a^c$ (nm)	Lc^d (nm)	Reference
Gliadin mixture	Pure water	4.10–6.46	7.50	10.8	–	–	Sato et al. 2015
α-gliadins	70% (v/v) ethanol	3.55	3.20	11.7	15.1	15.8	Thomson et al. 1999
γ-gliadins	70% (v/v) ethanol	3.80	3.25	12.5	16.2	17.7	Thomson et al. 1999
	1% acetic acid	2.66	3.40	9.2	–	–	Thomson et al. 1992
ω-gliadins	70% (v/v) ethanol	4.60	3.25	15.4	19.9	26.3	Thomson et al. 1999

[a] The diameter calculated assuming a rod model

[b] The length calculated assuming a rod model

[c] Twice the major semi-axis calculated assuming a prolate ellipsoid

[d] The contour length

Fig. 1.17: Modélisation des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles par des modèles en cylindre (de diamètre d et de longueur L) et en ellipsoïde (de diamètre $2a$). (Image [66])

les gliadines γ sont en meilleur solvant dans un solvant éthanol à 70 % que dans un solvant d'acide acétique à 1%. La longueur $2a$ de l'ellipsoïde modélisée est plus proche de la longueur maximale L_c que la longueur L du cylindre modélisé, ce qui montre que la modélisation d'une ellipsoïde est plus en accord avec les mesures que la modélisation par un cylindre.

1.3.1.3 Propriétés fonctionnelles

Les gliadines ont des propriétés moussantes [76] et émulsifiantes [77].
La mesure temporelle de la tension de surface pour des solutions de gliadines, de globulines de soja de β-caséine (fig. 1.18) montre la décroissance de tension de surface avec le temps. Les gliadines abaissent la tension de surface avec le temps jusqu'à des valeurs plus basses que les globulines de soja et la β-caséine. Dans ce solvant, l'activité de surface des gliadines est supérieure aux protéines utilisées dans le commerce comme les globulines de soja (aussi appelées glycinine) ou bien à la β-

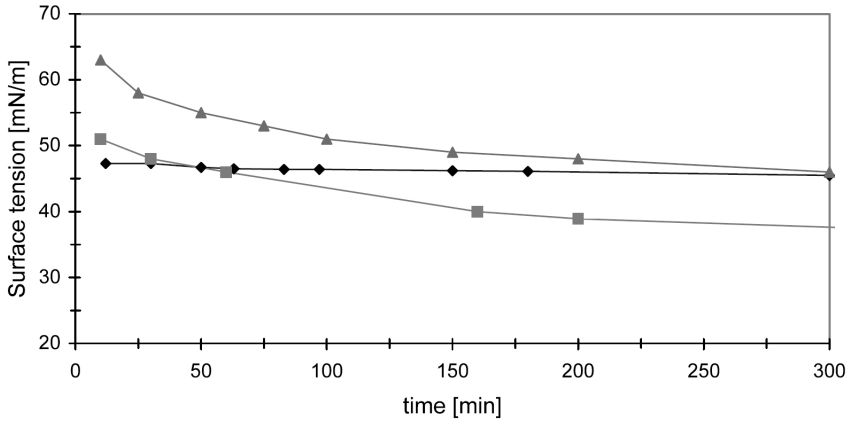


Fig. 1.18: Tension de surface en fonction du temps à l'interface air/eau de solution de gliadines (carrés), de β-caséine (losanges) et de globulines de soja (triangles). Les protéines sont dispersées dans un solvant tampon phosphate au pH 6.7 , $I = 30$ mM. (Image [78])

caséine.
Par ailleurs, la formation du film interfacial de solution de gliadines a été étudiée par spectrométrie infra-rouge. Par mesures de spectroscopie d'absorption infrarouge en réflexion de lumière sur un film de gliadines γ à l'interface air/eau (fig. 1.19), A. Banc et al. ont montré que lors de la compression du film (fig. 1.19 (a)), les pics correspondant à la signature de zones non structurées (1645 cm^{-1}) et de feuillets β (1628 cm^{-1}) augmentent tous deux (fig. 1.19 (b)). Cela montre que la formation de feuillets β par compression du film est possible et peut être induite à partir d'une pression de surface supérieure à 10 mN/m [48].

Concernant les propriétés moussantes des gliadines, il a été montré récemment que des nanoparticules de gliadines (GNP) peuvent stabiliser l'interface air/eau et produire des mousses. La stabilité de ces mousses peut être comparés à celles produites par des protéines utilisées commercialement comme la caséinate de sodium [79]. Pour produire les GNP, les gliadines sont d'abord solubilisées dans un solvant eau/éthanol. Cette solution est ensuite diluée à 4 % v/v dans l'eau pure et agitée vigoureusement. Les GNP ainsi formées sont caractérisées par l'outil zetasizer (Malvern Instrument). La distribution de tailles des nanoparticules est comprise entre 50 et 200 nm [79].
La figure 1.20 montre des clichés microscopiques de mousses formées avec les GNP à différentes concentrations allant de 0.05 à 1 g/L. La taille des bulles augmente avec le temps indiquant la coalescence des gouttes. Pour une augmentation de la concentration en GNP, la taille des bulles est plus stable avec le temps, la coalescence des gouttes est donc réduite. Dans l'article présenté ici, l'aptitude moussante se calcule par le volume de mousse formée par rapport au volume de solution initiale, au bout de 2 min. La stabilité de la mousse est calculée par le rapport du volume de mousse au bout de 60 min sur le volume de mousse au bout de 2 min. L'aptitude moussante des GNP est trouvée un

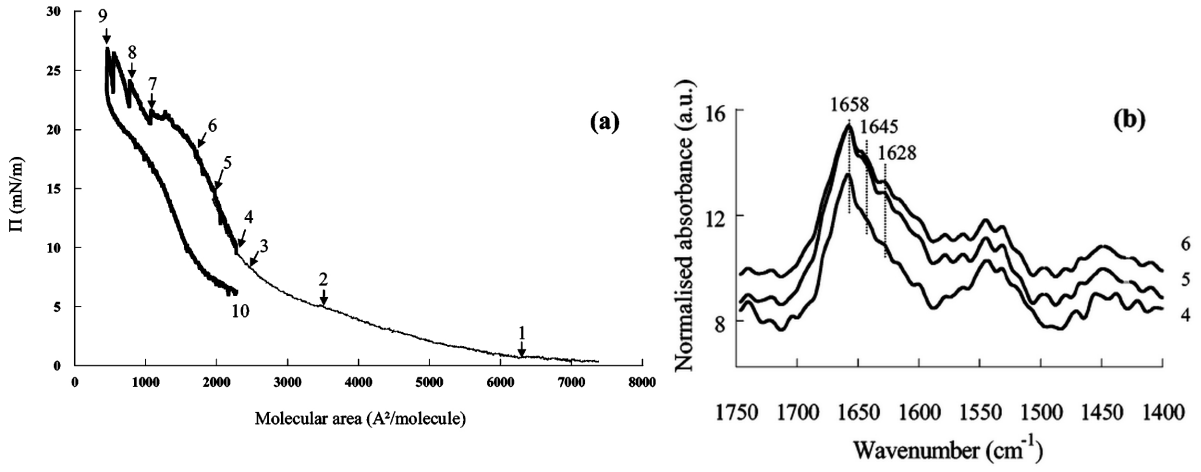


Fig. 1.19: a) Isotherme de compression à l'interface air/eau. Le trait épais correspond à la deuxième expérimentation afin d'obtenir toute la gamme de pression de surface. Les chiffres correspondent à la pression de surface des différentes mesures de spectroscopie d'absorption infrarouge en réflexion (PM IRRAS).
b) Spectre PM IRRAS dans les pressions de surface 4, 5, 6 indiqués en (a) (Image [79])

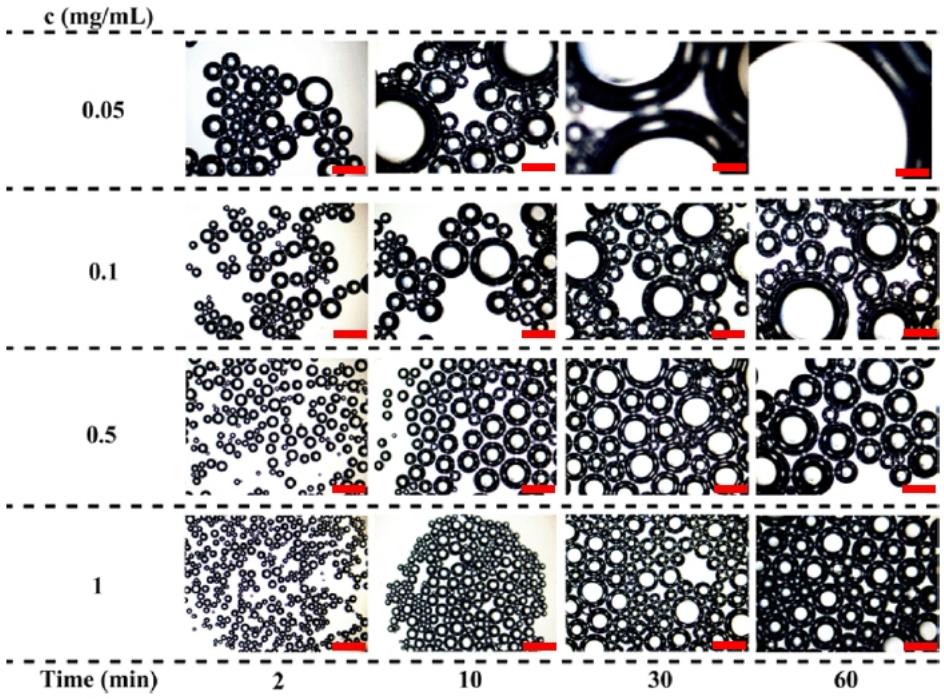


Fig. 1.20: Clichés microscopiques de mousses formées avec les GNP à différentes concentrations (0.05 - 1 g/L) avec le temps de vieillissement de la mousse formée. La barre en bas à droite de chaque image correspond à 300 μm. (Image [79])

ordre de grandeur plus élevée que la mousse produite par l'ovalbumine et la caséinate de sodium. La stabilité de la mousse est trouvée deux fois plus élevée que celle trouvée pour la caséinate de sodium et quatre fois plus élevé que pour la mousse formée par l'ovalbumine. Cela est attribué à un effet Pickering qui limite la coalescence des gouttes.

Les gliadines seules ne sont pas connues pour gélifier néanmoins elles impactent les propriétés viscoélastiques du gluten.
La figure 1.21 (b) montre l'évolution de G' et de $\tan\delta$ ($\tan\delta = \frac{G''}{G'}$) avec la fraction massique de gliadines ajoutées dans le gluten. La fraction de gliadines est préparée selon la méthode [68], puis ajouté à la farine de blé. La farine est ensuite lavée à l'eau distillée afin d'obtenir le gluten contenant la fraction de gliadines ajoutée. L'élasticité du gluten augmente avec l'ajout de gliadines jusqu'à 0.5 % d'ajout. Le facteur de perte augmente à partir de fractions ajoutée entre 0.25 et 0.5 % w/w.
La contribution des gliadines a également été étudié par l'ajout de différentes fractions de gliadines et il a été montré que l'ajout de gliadines α/β et γ augmente les propriétés élastiques du gluten, contrairement à l'ajout de gliadines ω qui limitent faiblement l'élasticité [80]. L'ajout des différentes fractions de gliadines dans le gluten semble limité d'avantage l'élasticité du gluten que la somme de chaque fraction séparée. Cela suggère une interaction entre les gliadines limitant d'avantage le module élastique et met en évidence la contribution visqueuse des gliadines dans le gluten.

En résumé, au travers de la littérature, des changements de conformations ont été mis en évidences

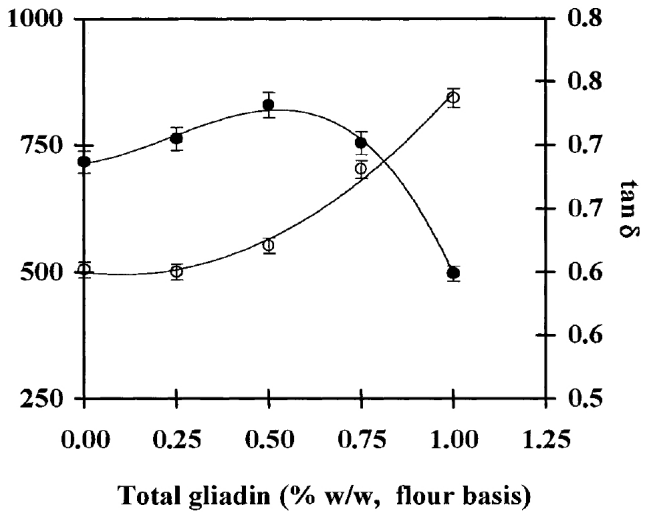


Fig. 1.21: Module élastique de cisaillement G' (ronds pleins) et facteur de perte tan δ (ronds vides) en fonction de la fraction massique de gliadines ajoutées au gluten. Contrainte imposée $\sigma = 25$ Pa, $f = 1$ Hz. (Image [80])

lors de l'augmentation de pression de surface. Au niveau des propriétés fonctionnelles, les gliadines sont connues pour avoir de bonnes propriétés émulsifiantes et moussante, des brevets sont déposés pour l'extraction et la formulation (EP 1414310 B1, WD 98117251, EP 1608330).

1.3.2 Protéines de réserve du tournesol

Le tourteau de tournesol est un sous-produit de la production d'huile. Il est constitué d'environ 30 % de protéines dont les deux principales familles sont les globulines et les albumines de tournesol. Les globulines représentent 40 à 90 % de la fraction protéique totale et les albumines 10 à 30 %, selon la variété de tournesol [81]. Les fractions protéique restantes sont composées de prolamines, de glutélines et de segments polypeptidiques libres. Lors de l'extraction des protéines issues du tourteau de tournesol, d'autres composés sont extraits et difficilement séparables des protéines [81]. Les composés phénoliques extraits avec les protéines de tournesol sont principalement de l'acide chlorogénique et caféique (fig. 1.22 [82]). La présence de ces composés est liée à leur rôle central dans la défense de la plante contre les maladies [83]. Ils sont jugés comme facteurs anti nutritionnels car ils peuvent se lier aux protéines ce qui limite la digestibilité des protéines [84].
Les composés phénoliques sont également un frein dans l'utilisation de l'isolat protéique à cause de leur amertume et de la coloration noire qu'ils confèrent à la solution protéique [85].

1.3.2.1 Extraction

Il existe différentes voies possibles pour l'extraction de protéines de tournesol [86, 87]. On présente ici une méthode d'extraction utilisant la variation de pH de trois manières différentes.

Dans les trois types d'extraction (fig. 1.23), à pH basique, au point iso-électrique ou à pH acide, le

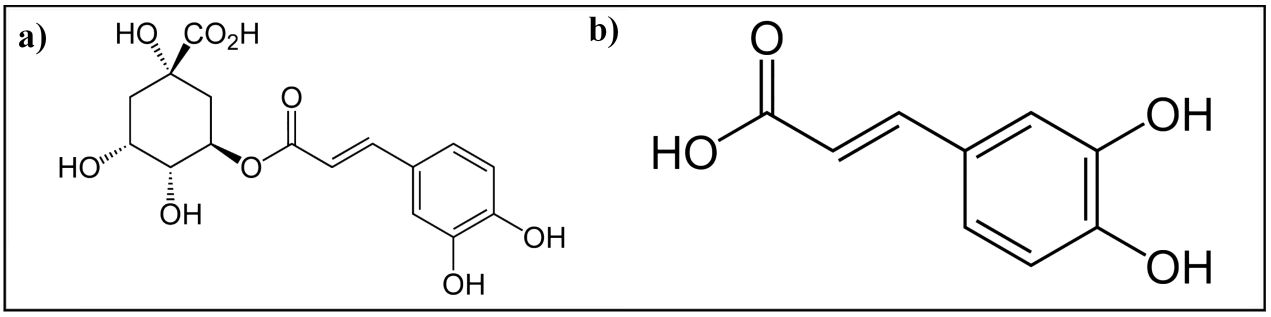


Fig. 1.22: Principaux composés phénoliques présents dans les isolats protéique de tournesol. Acide chlorogénique (a) et acide caféique (b).

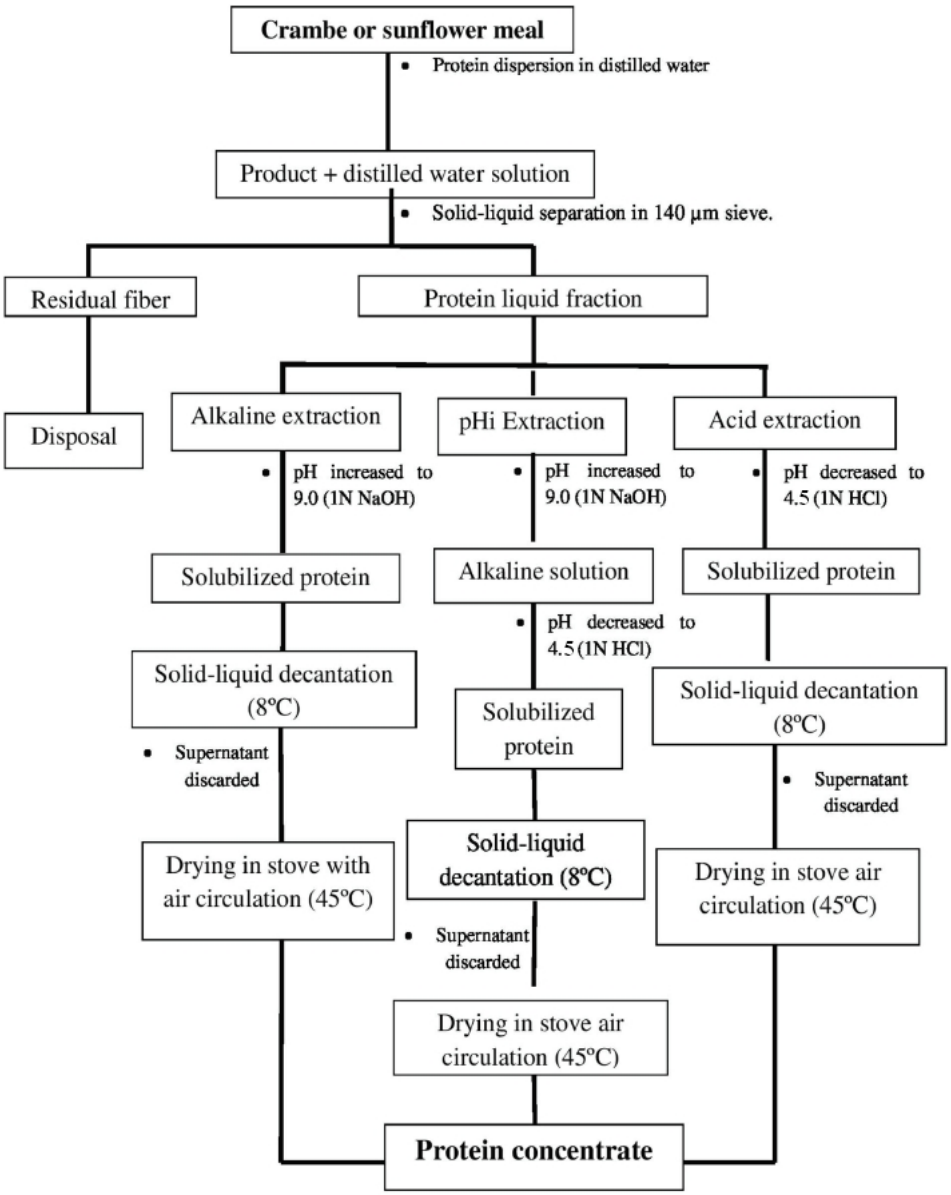


Fig. 1.23: Protocoles de purifications des protéines de tournesol par variation du pH. (Image [87])

tourteau est d'abord dispersé dans l'eau distillée et le mélange est tamisé avec un tami de maillage 140 μm. Pour l'extraction basique, le pH du mélange est ajusté à pH 9 avec l'ajout d'hydroxyde de sodium concentré pour maximiser la solubilisation des protéines. La solution est ensuite refroidie à 8°C et le précipité solide est récupéré puis séché avec une ventilation à 45°C.
Il contient principalement les globulines et albumines de tournesol. Pour l'extraction au point isoélectrique, le pH du mélange est ajusté à pH 9. Après agitation, le pH de la solution est abaissée à 4.5 avec l'ajout d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité est récupéré et séché. Il contient une plus grande proportion de globulines que le surnageant qui est lui décanté à 8°C. La séparation de phase solide/liquide permet de récupérer le précipité pour le sécher avec une ventilation à 45°C. L'extraction à pH acide consiste à abaissé le pH à 4.5 avec de l'acide chlorhydrique concentré le mélange eau/tourteau tamisé. La décantation à 8°C produit un précipité qui est ensuite récupéré et séché avec une ventilation à 45°C.
Une étude de ces trois protocoles montre que la plus grande fraction protéique est récupérée avec l'extraction basique et le passage au point iso électrique [87]. L'extraction par variation de pH est utilisée dans de nombreuses études récentes [82, 86, 88].

L'isolat utilisé pour ce travail de thèse a été purifié par un protocole breveté, sans variation de pH. Le pH de l'eau est maintenu constant tout au long des filtrations. Ce protocole est décrit quantitativement à la section 2.2.3.1. Le protocole mécanique a été choisit entre autres parce qu'il est transférable à l'échelle industrielle.

1.3.2.2 Structures

On distingue les globulines et les albumines de tournesol par leur coefficient de sédimentation [89]. Ces coefficients de sédimentation dépendent largement de l'environnement comme le pH, la force ionique et également de facteurs génétiques influençant la masse, la forme et la densité de la protéine . Néanmoins, on peut dégager quatre intervalles de coefficients de sédimentation pour les protéines de tournesol, les $1-4$S et $10-13$S correspondent aux albumines et aux globulines hexamériques, souvent appelées albumines 2S et globulines 11S. Les composés ayant des coefficients de sédimentation dans les intervalles $6-9$S et $15-18$S ont été observés dans une moindre mesure et correspondent aux trimères de globulines et aux agrégats de globulines, respectivement [81].

Les globulines 11S correspondent aux globulines de tournesol à l'état natif [90], elles sont hexamériques [91] et ont une masse molaire comprise entre 300 et 350 kDa [92] avec un point iso électrique entre 5.0 et 5.9 [93]. L'hexamère de globulines contient un nombre important d'acides aminés basique (234 arginines, 60 lysines) et acides (186 acides glutamique, 96 acides aspartique) ce qui correspond, dans le solvant NaOH, à une charge nette de +12 (séquence d'acides aminés P19084). D'après un gène codant pour les globulines de tournesol [94], le monomère de globuline contient une séquence peptidique acide de 30 à 40 kDa, lié par un pont disulfure à une séquence peptidique basique de masse molaire entre 23 et 27 kDa [94].

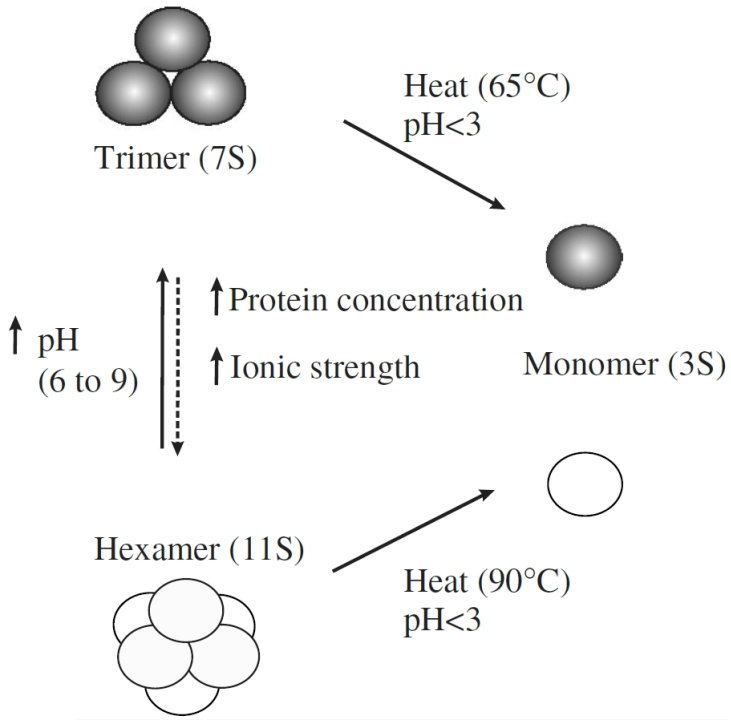


Fig. 1.24: Schéma de la structure quaternaire de la globuline de tournesol et des dissociations possibles (Image [81])

La figure 1.24 montre schématiquement les dissociations possibles de la globuline [93]. L'hexamère peut se dissocier en monomère de 50 à 60 kDa à 90°C ou dans une solution à pH 3. L'hexamère peut également se dissocier en trimère sous l'effet d'une élévation du pH jusqu'à pH 9. La concentration protéique et l'augmentation du pH a un effet inverse et permet la formation hexamérique par l'association de trimères. Le trimère de globuline peut aussi de dissocier en monomère autour de 60−65°C ou dans une solution à pH acide (pH 3) [93, 95].
Par définition, la solubilité des globulines est favorisée par l'augmentation de la force ionique. Les pH acides et basiques favorisent également la solubilité des globulines de tournesol.
La structure secondaire des globulines de tournesol, dans des solutions de pH 6.0 à 8.5, avec des forces ioniques de 0.5 à 1 M, est composée de 10 % d'hélices α, de 20 à 30 % de feuillets β et de 40 à 60 % de séquence peptidique non structurée [96]. Le monomère de globuline [97] se lie aux autres par les structures secondaires de la séquence peptidique, notamment les hélices α [98].

Les albumines 2S se composent d'une seule séquence peptidique de masse molaire entre 10 et 18 kDa [99] avec un point iso électrique à 8.8 [96, 100, 101]. Les albumines de tournesol contiennent une seule séquence peptidique dont les acides aminés confèrent à l'albumine une charge nette de -4 dans l'eau, en considérant que les pKa des acides aminés libre est identique à celui des acides aminés dans la séquence peptidique.

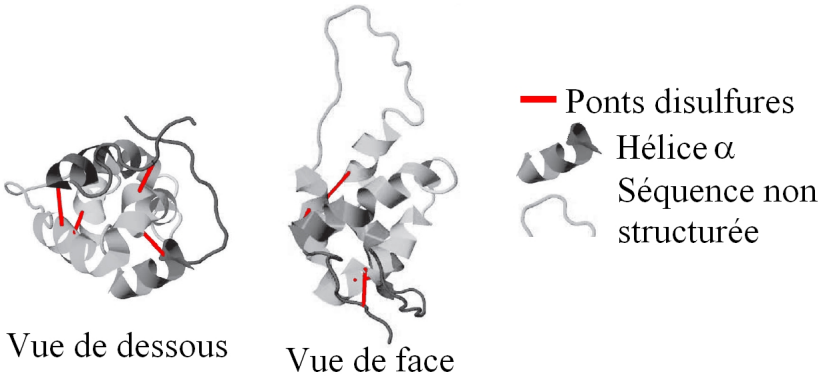


Fig. 1.25: Modélisation de la structure tertiaire de l'albumine de tournesol. (Image [96])

La structure secondaire de l'albumine de tournesol contient 30 % d'hélices α et 70 % de séquence désordonée. Les hélices α sont liées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures comme indiqué à la figure 1.25 [101, 102]. Les ponts disulfures (fig. 1.25) de l'albumine lui donnent une structure résistant à la hausse de température. Son point de dénaturation est mesuré entre 107°C et 118°C [101]. Les albumines de tournesol sont très solubles sur une large gamme de pH (2 à 9) [101].

1.3.2.3 Propriétés fonctionnelles

Les protéines de tournesol possèdent de bonnes aptitudes émulsifiantes [103] et moussantes [104]. La figure 1.26 (a) montre l'évolution du diamètre moyen des gouttes d'émulsions d'huile dans l'eau, obtenues avec les protéines de tournesol en fonction de la concentration protéique C.
Le diamètre moyen diminue avec la concentration C et se stabilise autour de 1 μm à partir d'une concentration protéique de 3 g/L. Autour de cette taille, les gouttes sont soumises au mouvement brownien, le crémage est alors largement réduit ce qui limite la coalescence des gouttes et favorise

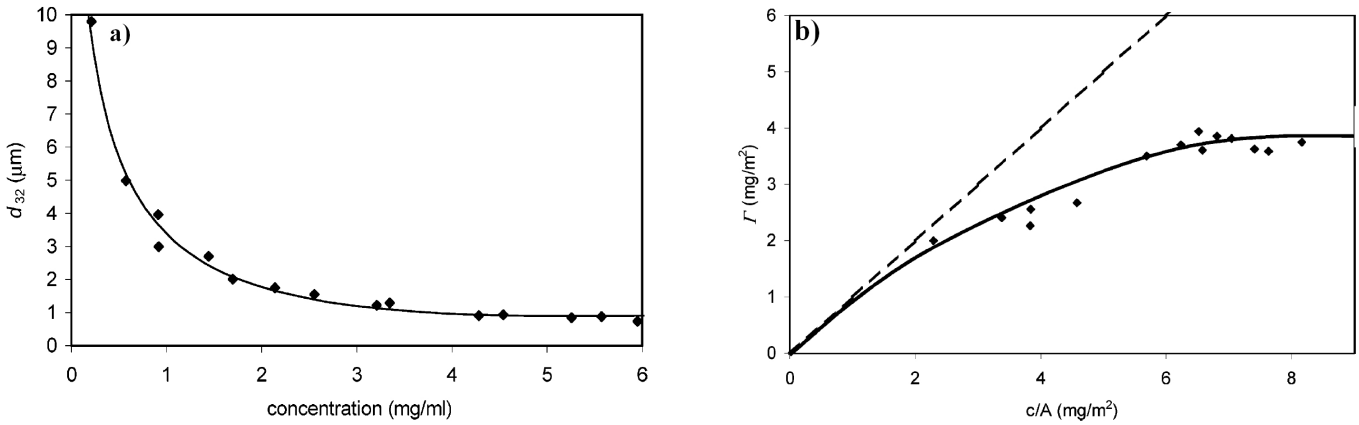


Fig. 1.26: a) Diamètre moyen des gouttes de l'émulsion obtenue avec un isolat de protéines de tournesol (pH 7, $I = 20$ mM) en fonction de la concentration protéique.
b) Concentration superficielle d'excès en fonction de la quantité totale de protéines adsorbées rapportée à l'aire totale de l'interface h/e. Le trait hachuré correspond à la concentration superficielle d'excès en considérant que la totalité des protéines sont adsorbées aux interfaces des gouttes d'huile. (Image [105])

donc la stabilité de l'émulsion. La figure 1.26 (b) montre l'évolution de la concentration superficielle d'excès en fonction de la quantité totale de protéines adsorbées rapportée à l'aire totale de l'interface huile/eau. Le trait hachuré correspond à la concentration superficielle d'excès en considérant que la totalité des protéines en solution sont adsorbées. La concentration superficielle d'excès semble atteindre une asymptote autour de 3.6 mg/m^2 ce qui correspond à la saturation du film interfacial.

Les protéines de tournesol se sont révélées être des agents émulsifiants potentiellement utilisables dans l'industrie agroalimentaire [105]. La stabilité des émulsions est plus grande avec les globulines qu'avec les albumines de tournesol [106].

La littérature [81, 107, 108], mentionne de faibles aptitudes gélifiantes. Pour des conditions physico-chimiques similaires, à 100 g/L le module élastique d'un isolat de tournesol est de 500 *Pa* alors que celui d'un isolat de soja est de 5000 *Pa*. Il existe peu d'études sur la gélification d'un isolat de tournesol non hydrolysé. Une étude très récente est présentée puis comparée à la littérature évaluant les propriétés gélifiantes de l'isolat de tournesol [4]. La figure 1.27 montre le module élastique en fonction du temps avec une rampe de température imposée.
Le palier de température maximale (95°C) est choisi de manière à être supérieure à la température de dénaturation des globulines de tournesol (90°C) afin de favoriser la gélification. Les paramètres de mesures du module élastique sont choisis de manière à être dans le domaine de réponse linéaire de la solution gélifiée. L'augmentation du module élastique a lieu dès les premiers moments de chauffe et augmente de manière plus abrupte à partir de 60°C pour ensuite se stabiliser à la fin du palier en température. Lors du refroidissement, le module élastique augmente légèrement jusqu'à environ 10 kPa avec ou sans traitement préalable de la solution dans un bain d'ultrasons. Le traitement aux ultrasons n'affecte pas l'évolution du module élastique de manière drastique.

Des propriétés gélifiantes remarquables ont été obtenues pour cet isolat protéique obtenu par

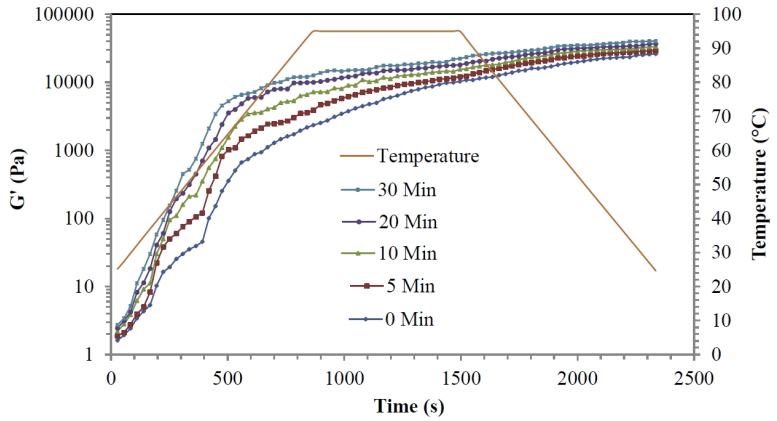


Fig. 1.27: Evolution temporelle du module d'élasticité d'une solution de protéines de tournesol (200 g/L dans l'eau distillée, $\gamma = 0.1$ %, $f = 1$ Hz) au cours d'un traitement thermique. La solution est soumise préalablement à un bain d'ultrasons à 20 KHz (500 W, 25 % d'amplitude) pendant 0, 5, 10, 20 et 30 min. (Image [4])

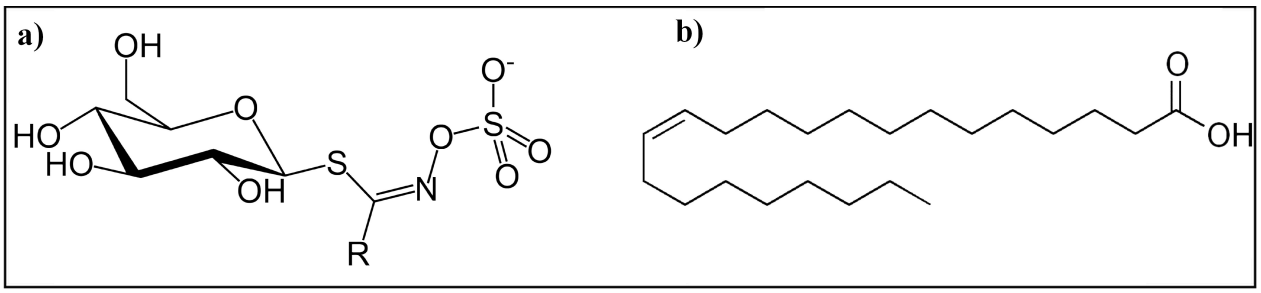


Fig. 1.28: Schéma du glucosinolate (a) et de l'acide érucique (b). (Image [111])

précipitation iso-électrique. Il est surprenant que l'auteur ne discute pas ces propriétés élastiques très supérieurs à ce qui a été mentionné dans la littérature.

1.3.3 Protéines de réserve du colza

Le tourteau issu de la trituration des graines de colza est très riche en globulines 12S (aussi appelées cruciférines) et albumines de colza 2S (aussi appelées napines). Le tourteau contient entre 30 et 40 % de protéines [109]. 25 à 65 % de la fraction protéique sont des globulines de colza et 10 à 50 % de la fraction protéique total sont des albumines de colza, selon la variété de colza. Les fractions protéique restantes sont composées de prolamines, de glutélines et de segments polypeptidiques libres [85]. Après la production d'huile, le tourteau de colza est principalement à destination animale. Deux composants présents dans le tourteau ont limité son utilisation, le glucosinolate et l'acide érucique (fig. 1.28) [110].

Des troubles physiologiques ont été remarquées chez les animaux ayant une alimentation trop riche en glucosinolates et en acide érucique contenus dans le tourteau et l'huile de colza. Cela a conduit au développement d'une variété de colza produisant une faible quantité d'acide érucique et de glucosinolate, appelée "double zero" [112]. Pour cette variété, la norme de glucosinolates dans le tourteau est fixée à 18 μmol/g (www.info.agriculture.gouv.fr) et 2 % (w/w) d'acide érucique [113]. Lors de l'extraction des protéines, des composés peuvent rester accrochés aux protéines, comme l'acide phytique et les composés phénoliques comme l'acide sinapique, principal composé phénolique présent dans l'isolat de colza.

L'acide phytique contient six groupes phosphate (fig. 1.29 (a)). Dans l'eau, cinq protons sont forte-

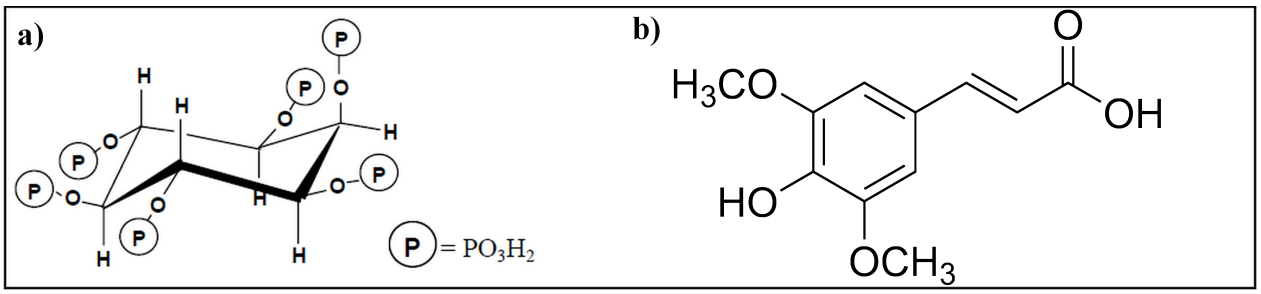


Fig. 1.29: Schéma de l'acide phytique (a) et de l'acide sinapique (b). (Image [111])

ment dissociés (pKa $= 1.9 - 2.4 - 3.2 - 5.2 - 6.3$) et trois ne sont dissociable qu'à des pH basiques (pKa $= 8.0 - 9.2 - 9.5$) [114]. Cet acide se complexe avec les minéraux (cations calcium, magnesium) et limite donc l'ingestion de ces minéraux par l'organisme. L'acide phytique [115], comme les composés phénoliques [112] se fixe également aux zones chargées positivement des protéines.
Les isolats utilisés au cours de cette thèse sont issus d'une variété double zero.

1.3.3.1 Extraction

La purification des protéines de colza, comme celle des protéines de tournesol, peut se faire de différentes manières. Les purifications par précipitation micellaire et par variation de pH sont présentées sur la figure 1.30.
La figure 1.30 montre les étapes de purification du tourteau de colza. Le tourteau est initialement dégraissé et déphénolisé par mélange à l'hexane puis séché à l'air ventilé à 40°C. Le tourteau est ensuite mélangé à une solution d'hydroxyde de sodium à pH 10 puis centrifugé à 10 000× g pendant 30 min. La phase surnageante est récupérée. La distinction des protocoles par précipitation micellaire ou par variation de pH intervient pour les étapes suivantes :

Pour extraire les protéines par précipitation micellaire, le surnageant est filtré par ultrafiltration, puis refroidi à 8°C et centrifugé 10 000× g pendant 30 min. Le culot est récupéré, broyé puis lyophilisé. Il contient principalement des globulines et des albumines de colza mais peut ne contenir que des albumines si les pores des filtres sont suffisamment fins.

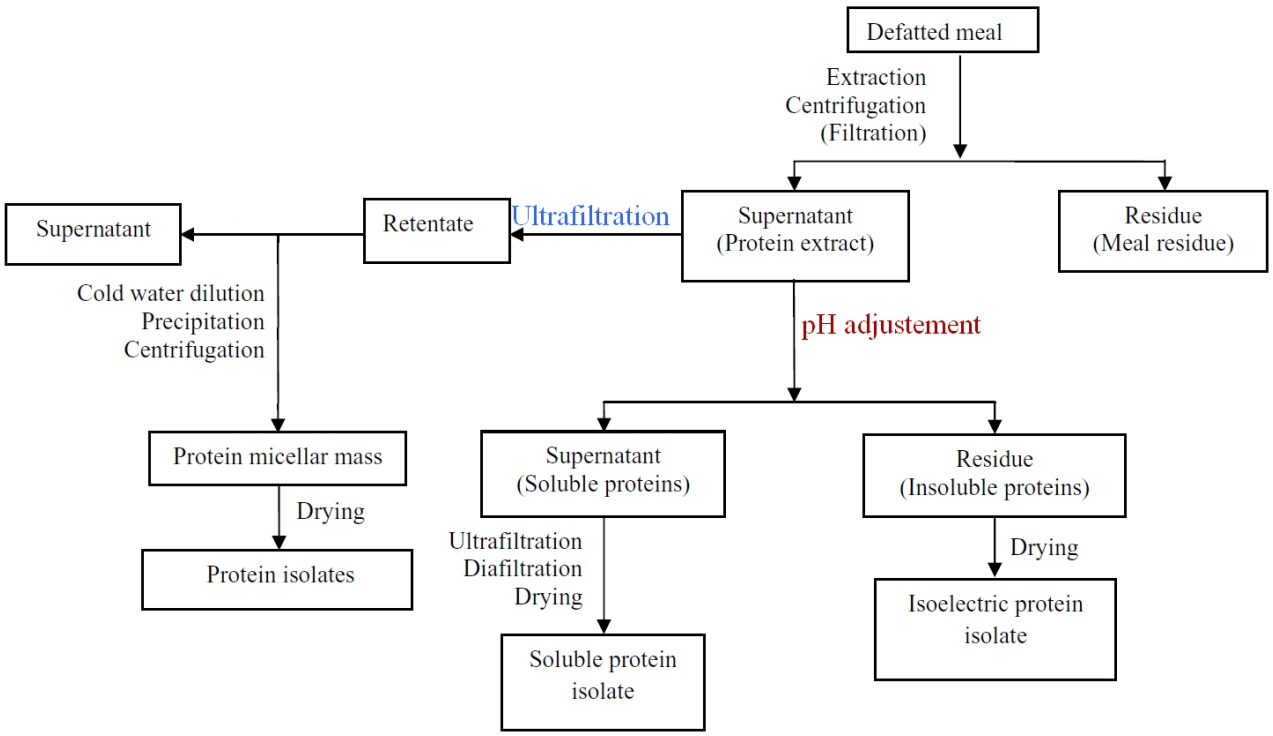


Fig. 1.30: Schéma des protocoles de purification des protéines de colza par précipitation micellaire (bleu) et par variations de pH (rouge). (Image [113])

Pour extraire les protéines par variation de pH, le pH du surnageant est abaissé à 3.5 puis remonté jusqu'à 7.5. La fraction soluble contient principalement des albumines alors que le précipité contient principalement des globulines. La fraction soluble peut être purifiée par ultrafiltration et diafiltration avant d'être lyophilisé. Le précipité est récupéré, broyé puis lyophilisé [110].
Le protocole utilisé pour la purification de l'isolat de ce projet de thèse correspond à une extraction par pH acide et une purification mécanique par filtration et diafiltration.

1.3.3.2 Structures

Les globulines de colza, tout comme celles du tournesol, sont des héxamères de masse molaire comprise entre 300 et 350 kDa [119], avec un point isoélectrique à 7.2 [120]. L'héxamère peut se dissocier en trimère et monomère [97, 121]. De la même manière que pour les globulines de tournesol, les interactions entre les trimères formant l'hexamère de globulines de colza sont principalement de nature non convalentes [122], on peut donc suggérer un impact du pH et de la force ionique dans la formation et la dissociation des hexamères et trimères de globulines de colza, toutefois aucune étude sur la dissociation des globulines de colza n'a été trouvée. Le monomère contient une séquence peptidique acide, liée à une séquence peptide basique par un pont disulfure [123, 124]. D'après la composition de l'hexamère en acides aminés chargés au pH de l'eau (180 arginines, 72 lysines, 138 acides glutamique et 138 acides aspartique d'après la séquence primaire), la charge nette est de -6

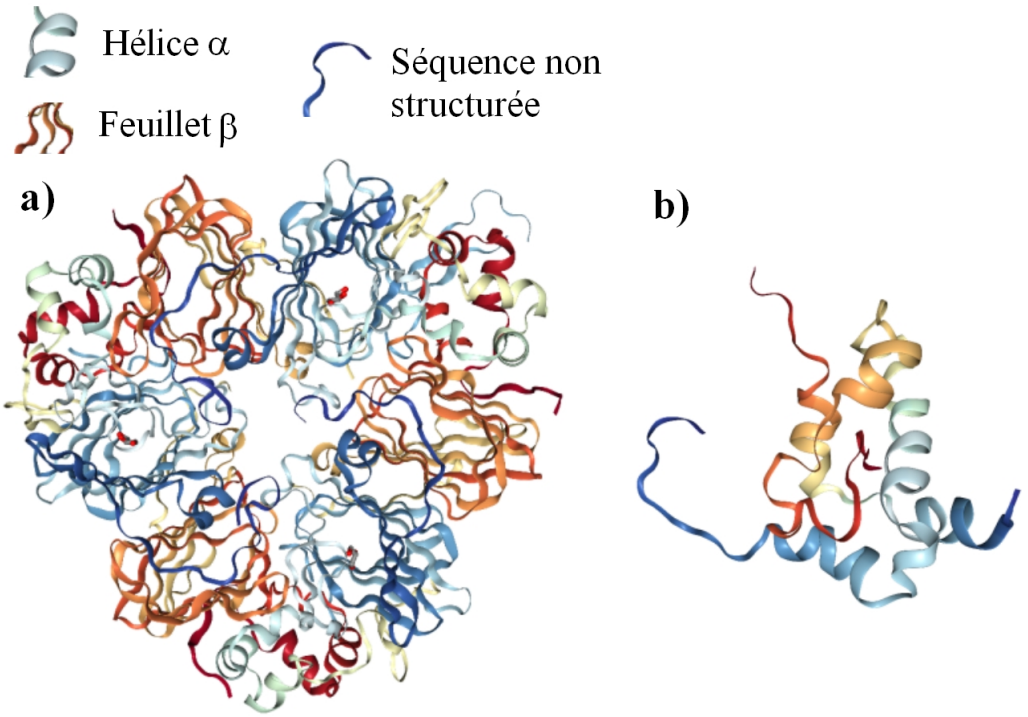


Fig. 1.31: a) Structure de la globuline de colza hexamérique, obtenue par diffraction des rayons X par un cristal (Identifiants protein data bank : 3KGL) [116].
b) Structure de l'albumine de colza obtenue par résonnance magnétique nucléaire en solution (Identifiants protein data bank : 1PNB [117]) . (Image [118])

à pH 7 en considérant que les pKa des acides aminés libres sont identiques à ceux liés par liaisons peptidiques. Le monomère contient 44 % de feuillets β et 11 % d'hélices α et 45 % de séquence non structuré dans une solution à pH 7 [121]. Les globulines de colza hexamériques ont une température de dénaturation de 84°C pour des pH de 7 à 10.

Les albumines de colza sont des monomères de 12.5 à 14.5 kDa avec un point isoélectrique à 10.7 [109]. L'albumine de colza contient deux chaînes peptidiques liées entre elles par deux ponts disulfures. La plus petite séquence peptidique contient deux cystéines [125] alors que la plus grande séquence peptidique contient six cystéines, deux d'entre elles forment des ponts disulfures avec la séquence peptidique courte, les quatre restantes forment deux ponts disulfures intra-moléculaires [126]. Les albumines de colza contiennent 24 à 27 % d'hélices α pour des pH de 3 à 10. La séquence non structurée représente 73 à 76 % de la séquence totale (fig. 1.31) [121]. La dénaturation des albumines est observée pour des températures autour de 100°C [121]. De plus, des températures où l'albumine change de conformations ont été observées à 50°C et 60°C [121].

1.3.3.3 Propriétés fonctionnelles

Les propriétés tensio-actives d'isolats de colza plus ou moins riches en globulines et albumines ont été étudiées à l'interface air/eau [127].
La figure 1.32 montre l'évolution de la pression de surface à l'interface air/eau, sous compression d'un film monocouche d'albumines de colza (1), d'un mélange comprenant 70 % de globulines et 30 % d'albumines de colza (2) et de globulines de colza (3). Pour les albumines de colza (1), la pression de surface augmente à faible concentration de surface (1 m^2/mg) alors que pour les globulines (3)

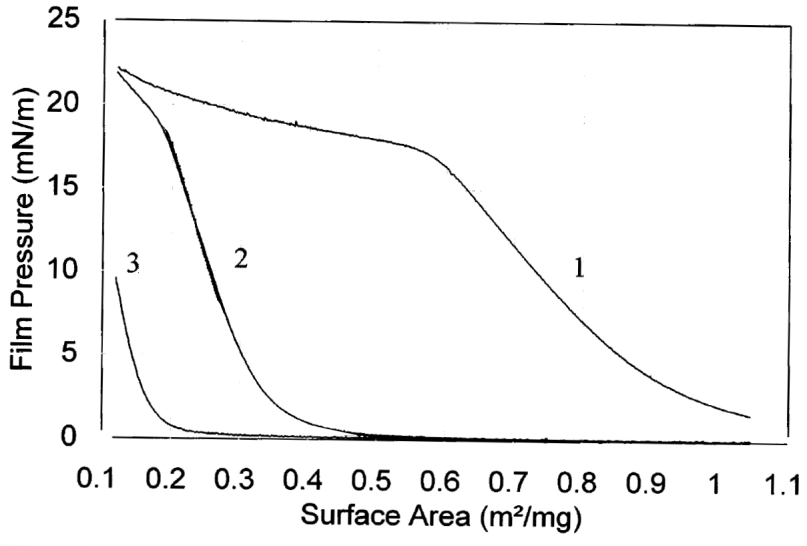


Fig. 1.32: Pression de surface en fonction de l'inverse de la concentration superficielle d'excès pour les albumines de colza (1), un mélange 70 % de globulines et 30 % d'albumines de colza (2), les globulines de colza (3), à l'interface air/eau. (Image modifiée de [127])

la pression commence à augmenter à partir de 0.2 m^2/mg. La pression de surface maximale est de 8 mN/m. Pour le mélange globulines/albumine et l'isolat de colza, la pression de surface augmente à partir de 0.5 m^2/mg et atteint 22 mN/m. L'augmentation de pression de surface à faible concentration superficielle d'excès est liée à la couverture de surface, plus grande pour les albumines de colza que pour les globulines pour une même masse. Cela est attribué à la masse molaire des albumines (12.5-14.5 kDa)beaucoup plus basse que pour les globulines (300-350 kDa) que l'on peut lier à l'aire moléculaire des albumines à l'interface air/eau qui est de 23 nm^2 contrairement aux globulines de colza dont l'aire par protéine est trouvée à 144 nm^2. L'augmentation de la pression de surface jusqu'à 22 mN/m pour le mélange globulines/albumines et les albumines montrent que ce sont les albumines qui guident le maximum de pression de surface. Cela est attribuée au grand nombre d'albumines à l'interface, devant celui des globulines [127].

Grâce à leur propriétés interfaciales, les albumines de colza montrent de bonnes propriétés moussantes [128] et émulsifiantes [129]. L'étude présentée ici montre l'évolution temporelle du diamètre moyen des gouttes des émulsions obtenues à pH 4 (A), pH 7 (B) et pH 9 (C) avec les albumines de colza (carrés rouges), les globulines de colza (triangles jaunes), un isolat total de protéines de colza (ronds verts) et un isolat de soja (croix bleues). L'isolat de soja a été choisi comme comparaison car il est utilisé commercialement (fig. 1.33). Les tailles des gouttes restent stables exceptées pour l'isolat

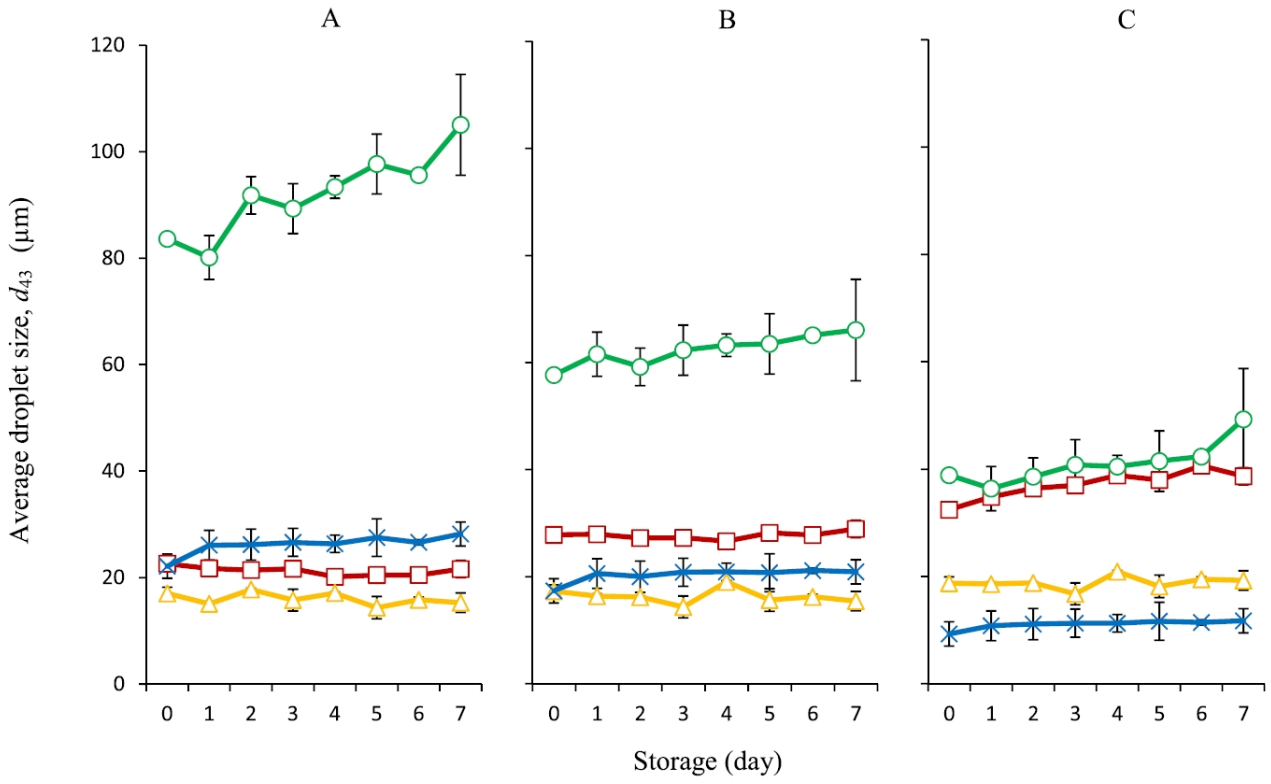


Fig. 1.33: Diamètre moyen des gouttes d'émulsions obtenues à pH 4 (A), pH 7 (B) et pH 9 (C) avec les albumines de colza (carrés rouges), les globulines de colza (triangles jaunes), un isolat de protéines de colza (ronds verts) et un isolat de soja (croix bleues) pendant 7 jours. (Image [129])

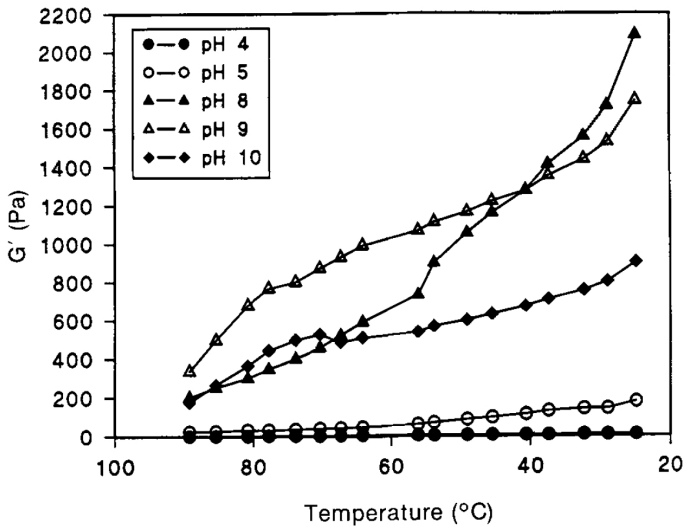


Fig. 1.34: Module élastique de cisaillement G' d'une solution protéique à 9 % (w/w), après gélification à 90°C, avec le refroidissement de température, pour des solutions de pH 4 à 10 ($\gamma = 2$ %, $f = 0.1$ Hz). (Image [130])

total de colza où l'on observe une coalescence plus marquée à pH 4. D'après S. H. Tan et al. cela est dû au processus d'extraction alcalin de l'isolat qui a dénaturé les protéines contrairement à la purification des globulines et albumines où l'extraction a été effectuée à l'eau salée pour les globulines et l'eau pure pour les albumines. Le diamètre des gouttes produites avec les globulines de colza est plus bas que celui des albumines sur tous les pH utilisés, ce qui montre que les globulines de colza ont de meilleures aptitudes émulsifiantes que les albumines de colza. Pourtant, comme on l'a vue dans le paragraphe précédent, les albumines ont une aptitude tensio-active supérieur aux globulines pour nue masse donnée. L'aptitude émulsifiante n'est donc pas principalement due à l'aptitude tensio-active du composé. Les globulines de colza ont également de meilleures aptitudes stabilisantes que le soja pour les pH 4 et 7. Cela rend les globulines de colza potentiellement valorisables dans les procédés de formulation.

Les propriétés gélifiantes du tourteau de colza sont également étudiées [130].
La figure 1.34 montre le module élastique de cisaillement G' après gélification à 90°C, avec le refroidissement de température, pour des solutions de pH 4 à 10. La solution est préparée à 9 % (w/w) de protéines. A tous les pH, exceptés aux pH extrêmes (4 et 10), la solution protéique gélifie. Les solutions préparées aux pH 5,6 et 7 montrent une faible augmentation de G' avec le refroidissement. Cela suggère que les changements de conformations et les répulsions électrostatiques dues au pH acide vont limiter la gélification de la solution. Pour les solutions aux pH 8 à 10, le module élastique augmente franchement avec le refroidissement. Cela indique que les interactions attractives sont en suffisamment grands nombres devant les interactions répulsives pour former un gel. G' est maximale pour une solution à pH 8 ce qui est proche du point iso électrique des globulines de tournesol. Les interactions électrostatiques inter-protéiques sont minimisées à ce pH.

Les propriétés emulsifiantes et gélifiantes ont également fait l'objet d'études. Les propriétés gélifiantes sont toutefois moins bonnes que celles obtenus avec des produits commerciaux comme le soja ou le lin [131]. Des mélanges avec d'autres composés permettent néanmoins d'aboutir à des propriétés fonctionnelles viables [132].

1.4 Objectifs du travail de thèse

Les propriétés fonctionnelles des protéines de blé, de tournesol et de colza sont connues et potentiellement valorisables. Dans les contextes de santé publique et de développement durable, l'utilisation de protéines végétales pour l'alimentation humaine se fait de plus en plus prégnant.
Puisque la France est parmi les plus gros producteurs mondiaux d'oléagineux comme le tournesol et le colza, l'Etat a financé de nombreux projets de développement autour des plantes oléagineuses. Cela a aboutit, entre autres, à la purification de tourteaux issus de la production d'huile de tournesol et de colza, viable pour l'industrie et la consommation humaine. Cette levée de verrous significative dans le développement de produits bio-sourcés a donné lieu à une étude des isolats produits. L'objectif de cette thèse est d'étudier les propriétés fonctionnelles de surface et les propriétés en volume des isolats en solution avec une approche multi-échelle qui combine les mesures temporelles de pression de surface, de concentration superficielle d'excès et de rhéologie dilatationnelle interfaciale.

Les propriétés des isolats de tournesol et de colza en solutions sont évalués par spectrométrie, chromatographie en phase liquide à haute pression, électrophorèse et diffusion dynamique de la lumière. Le criblage des conditions physico-chimiques de solution favorisant la gélification sont effectuées. Les modules élastiques et visqueux d'une solution au cours du processus de gélification sont mesurés et interprétés.
L'étude interfaciale associe de manière originale l'évolution temporelle de pression de surface à l'évolution du profil optique de l'interface sondée par éllipsométrie. Les propriétés viscoélastiques interfaciales sont évaluées au cours de la formation du film, par la méthode de la goutte pendante.

2. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIAUX UTILISÉS

2.1 Méthodes

2.1.1 Réfractométrie

Pour déterminer l'indice de réfraction d'une substance le réfractomètre d'Abbé utilise l'angle de réfraction limite au delà duquel la lumière n'est pas réfractée [133]. Le réfractomètre d'Abbé nécessite que l'indice de réfraction n de la substance soit inférieur à l'indice de réfraction n_1 du prisme support [134]. L'indice de réfraction dépend de la longueur d'onde et dans le cas du réfratomètre d'Abbé, la lumière blanche contenant tout le spectreu visible est utilisée. Dans ce cas, la lumière se propage du milieu d'indice inférieur au milieu d'indice supérieur. L'angle de réfraction limite est alors produit pour un angle $\theta_0 = 90°$ (fig. 2.1). Pour une lumière rasante ($\theta_0 \to 90°$) les faisceaux incidents sont réfractés avec l'angle de réfraction θ_1 jusqu'à l'angle de réfraction limite θ_{lim} ($\theta_1 \to \theta_{lim}$).

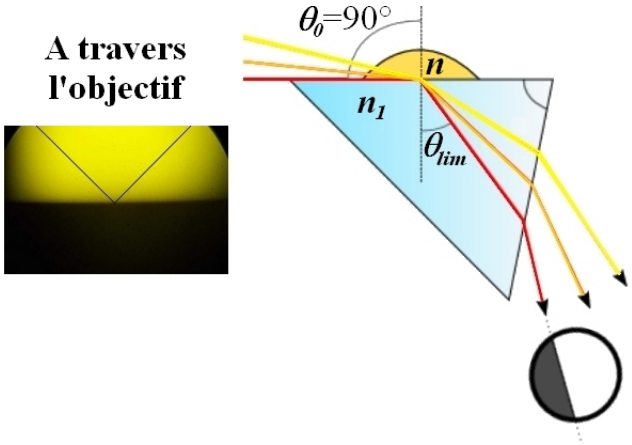


Fig. 2.1: A gauche, image à travers l'objectif, à droite, schéma de principe du réfractomètre d'Abbé. (Images : culturesciences.chimie.ens.fr)

La limite entre les faisceaux réfractés et réfléchis correspond à la limite entre les zones claire et sombre. Les faisceaux lumineux sont observés à travers un objectif marqué d'une croix (fig. 2.1). Une molette permet de faire correspondre la limite entre la zone claire et sombre avec le centre de l'objectif, mesurant ainsi θ_{lim}.

La relation de Snell-Descartes (eq. 2.1) donne accès à la valeur de l'indice de réfraction de la substance :

$$n\sin(\theta_0) = n_1\sin(\theta_1) \tag{2.1}$$

A l'incidence limite $\theta_0 = 90°$, la relation 2.1 devient :

$$n = n_1\sin(\theta_{lim}) \tag{2.2}$$

Le réfractomètre d'Abbé de marque Karl Zeiss (Allemagne) est utilisé pour déterminer l'indice de réfraction des protéines étudiées. Pour de faibles fractions volumiques en protéines ϕ_p la constante diélectrique ($\varepsilon = n^2$) d'une solution est linéaire avec la fraction volumique ϕ_p (Approximation de Wiener des milieux effectifs [135], eq. 2.3). La mesure du carré de l'indice de réfraction en fonction de la fraction en protéine $n^2 = f(\phi_p)$ permet d'estimer l'indice de réfraction de la protéine n_p. En

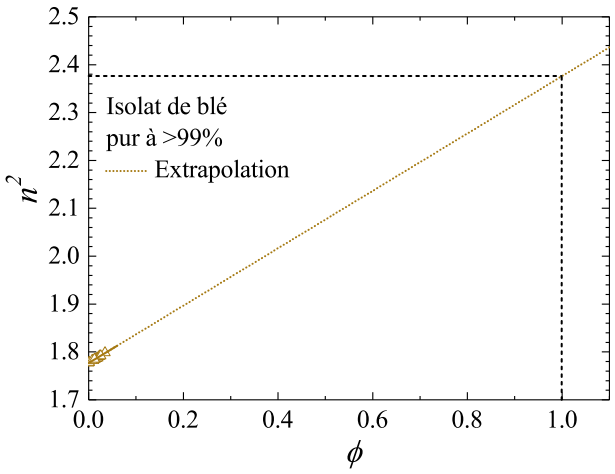


Fig. 2.2: Carré de l'indice de réfraction en fonction de la fraction volumique en gliadines dans le solvant acétique (pH 3.0). Ajusté (trait plein) et extrapoler à $\phi_p = 1$ (pointillés).

supposant que la proportionnalité entre n^2 et ϕ_p est valable à haute concentration on peut extrapoler l'indice réfraction de l'isolat protéique à $\phi_p = 1$ comme l'illustre la figure 2.2.

$$n^2 = n^2_{solvant} + \frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}\phi_p \tag{2.3}$$

$$n^2_p = n^2_{solvant} + \frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}.1 \tag{2.4}$$

L'extrapolation à $\phi_p \to 1$ de $n^2 = f(\phi_p)$ s'écrit de la manière suivante :

$$n_p = \sqrt{n^2_{solvant} + \frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}} \tag{2.5}$$

L'indice de réfraction des solutions de protéines est mesuré à température ambiante. Pour l'isolat de blé les fractions de protéines mesurées sont comprises entre $\phi_p = 0.0015$ et $\phi_p = 0.0345$. Pour l'isolat de tournesol, elles sont comprises entre $\phi_p = 0.0015$ et $\phi_p = 0.0751$. les résultats correspondent à la figure 2.27.

2.1.2 Analyse thermique

Le micro-calorimètre différentiel à balayage (micro differential scanning calorimetry, μDSC) est utilisé pour caractériser la température de dénaturation des isolats protéiques. Il mesure la différence de flux de chaleur ΔQ apportée à la référence et à l'échantillon lors d'une rampe de température imposée (fig. 2.3). ΔQ est défini par la relation suivante :

$$\Delta Q = \frac{Q_{ech} - Q_{ref}}{\Delta t} \tag{2.6}$$

Où Q_{ech} est la chaleur apportée à l'échantillon, Q_{ref} la chaleur apportée à la référence, pendant une durée Δt, nécessaire au suivi d'une rampe de température imposée.

La différence de flux sera non nulle lors de la dénaturation des protéines. La dénaturation est un ensemble de réactions modifiant la structure de la protéine par rupture de liaisons intra et inter moléculaires. L'ensemble des réactions est endothermique [136]. On peut alors déterminer une température de dénaturation et une enthalpie de réaction ΔH correspondant à la chaleur nécessaire au processus de dénaturation [137].

$$\Delta H = \int_{t_2}^{t_1} \Delta Q(t) \mathrm{d}t \tag{2.7}$$

ΔH est l'enthalpie de réaction ayant lieu entre les temps t_1 et t_2, $\Delta Q(t)$ l'évolution temporelle de la différence de flux de chaleur (eq. 2.6).

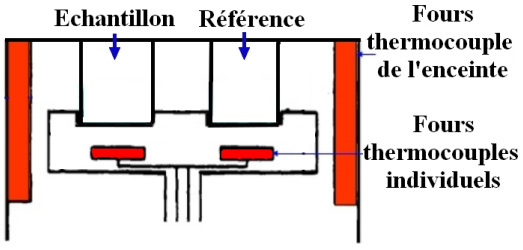


Fig. 2.3: Schéma de principe de la micro DSC utilisée (image : setaram.fr)

La microDSC III de marque Setaram (France) est utilisée pour mesurer les températures de déna-

turations des isolats de colza et de tournesol. La référence et la cuve de mesure contiennent respectivement 500μL de solvant et de solutions protéiques. La mesure est effectuée avec le profil de température suivant :

- Palier de 20°C pendant 15 min, pour l'homogénéisation thermique
- Croissance de 20°C à 120°C à 1°C/min
- Décroissance de 120°C à 20°C à 1°C/min

2.1.3 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering=DLS) utilise les fluctuations d'intensité diffusées par l'échantillon au cours du temps pour modéliser un coefficient de diffusion des objets diffusant la lumière.

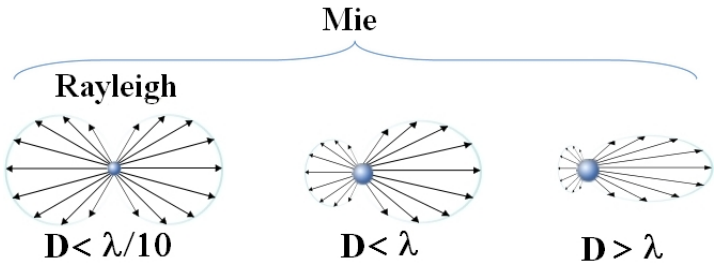


Fig. 2.4: Diffusion d'un faisceau arrivant par la gauche par un objet de diamètre D (Image : hesed.info)

On parle de diffusion de Mie [138] lorsque l'onde interférant avec l'objet garde la même fréquence, c'est le cas pour des objets immobiles de tailles comparables à la longueur d'onde de la lumière λ jusqu'à la taille moléculaire. Dans le cas où la taille de l'objet interférant avec l'onde est négligeable devant la longueur d'onde $R < \frac{\lambda}{10}$ l'onde absorbée par l'objet est émise de manière symétrique, comme indiqué figure 2.4, il s'agit du cas limite de la théorie de diffusion de Mie appelé diffusion de Rayleigh.

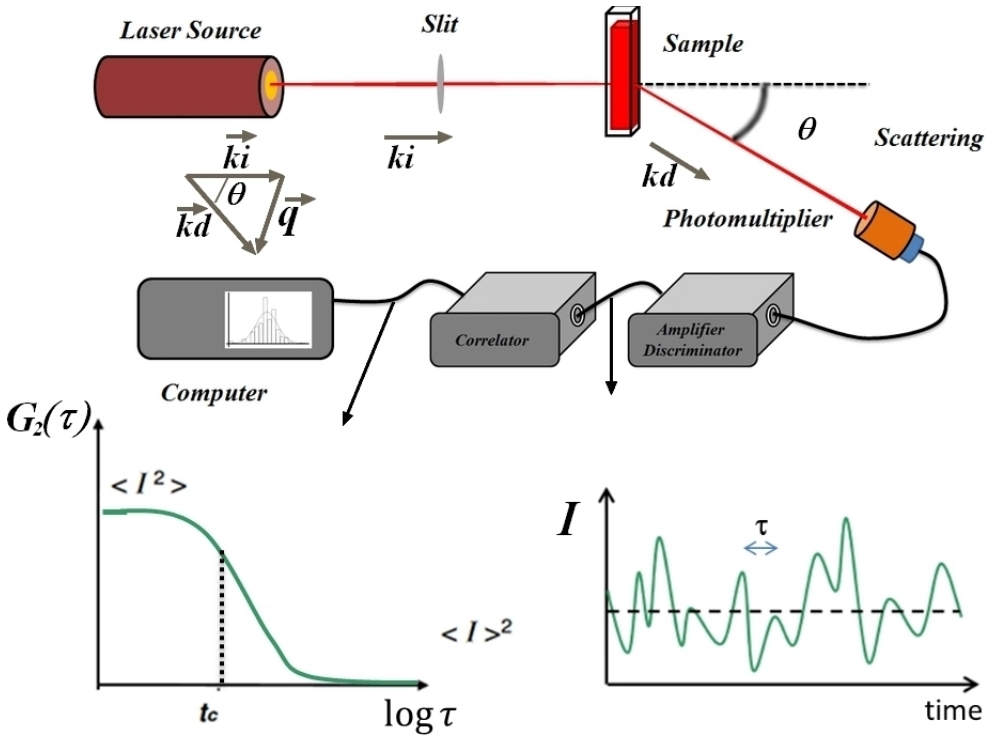


Fig. 2.5: Schéma de principe d'une DLS. (Images kuleuven.be)

Pour mesurer une intensité le milieu diffusant doit être hétérogène afin que les ondes diffusantes interfèrent. Dans une expérience classique de diffusion dynamique de la lumière (fig. 2.5) les fluctuations d'intensité sont extraites par construction d'une fonction d'autocorrelation des fluctuations d'intensité diffusées $G_2(\overrightarrow{q},\tau)$ définie de la manière suivante [139] :

$$G_2(\overrightarrow{q},\tau) = \langle I(\overrightarrow{q},0)I(\overrightarrow{q},\tau)\rangle_{t_m} \equiv \lim_{t_m\to\infty}\int_0^{t_m} I(\overrightarrow{q},t)I(\overrightarrow{q},t+\tau)\mathrm{d}t \tag{2.8}$$

La fonction d'autocorrélation normalisée de l'intensité diffusée s'écrit :

$$g_2(\overrightarrow{q},\tau) = \frac{\langle I(\overrightarrow{q},0)I(\overrightarrow{q},\tau)\rangle_{t_m}}{\langle I(\overrightarrow{q},0)\rangle^2_{t_m}} \tag{2.9}$$

Où $I(\overrightarrow{q},0)$ est l'intensité à l'instant initial, $I(\overrightarrow{q},\tau)$ l'intensité à l'instant τ, t_m la durée totale de la mesure et $\overrightarrow{q}$ le vecteur d'onde de diffusion (fig. 2.5). Le vecteur de diffusion est $\overrightarrow{q} = \overrightarrow{k_d} - \overrightarrow{k_i}$, où $\overrightarrow{k_d}$ est le vecteur d'onde de l'onde détectée, $\overrightarrow{k_i}$, le vecteur d'onde du faisceau laser incident (fig. 2.5). La norme du vecteur de diffusion vaut :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{2.10}$$

Où n est l'indice de réfraction du solvant, λ la longueur d'onde du faisceau incident et θ l'angle entre les vecteurs d'ondes $\overrightarrow{k_i}$ et $\overrightarrow{k_d}$.

Lorsque les fluctuations d'intensités sont dues au mouvement aléatoire d'objets dans le solvant, le temps caractéristique des fluctuations t_c est associé au coefficient de diffusion D des objets provoquant ces fluctuations [140]. On note $\Gamma = \frac{1}{t_c}$ le taux de décroissance. Il est lié au coefficient de diffusion par la relation suivante :

$$\Gamma = Dq^2 \tag{2.11}$$

Où D est le coefficient de diffusion, q le vecteur de diffusion.

A partir du coefficient de diffusion D, en assimilant l'objet à une sphère dure on peut estimer le rayon hydrodynamique de l'objet par la relation de Stokes Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \tag{2.12}$$

Où k_B la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du milieu, R_H le rayon hydrodynamique.
Ce rayon ne correspond pas aux dimensions de l'objet [141]. Le rayon hydrodynamique traduit seulement le déplacement de l'objet dans le milieu en rayon de sphère équivalente. La modélisation de la fonction normalisée des fluctuations d'intensité $g_2(\tau) - 1$ est effectuées par différents modèles prenant en compte un ou plusieurs temps caractéristiques de corrélation, associés à une taille (modèle mono exponentielle) ou une distribution de tailles (modèle des cumulants).

L'exponentielle simple modélise les fluctuations d'intensité provoquées par des composés ayant une seule taille correspondant au taux de décroissance τ :

$$g_2(\tau) - 1 = B_0 + A\exp^{-2\Gamma\tau} \tag{2.13}$$

Où B_0 correspond à la ligne de base, A est l'amplitude de la fonction de corrélation, τ le temps de retard.

L'analyse des cumulants d'ordre deux modélise une distribution de tailles [142] autour d'une taille moyenne, avec le taux décroissance moyen $\overline{\Gamma}$ et l'indice de polydispersité $\sigma^2 = \frac{\mu_2}{\overline{\Gamma}^2}$, par la fonction suivante :

$$g_2(\tau) - 1 = B_0 + A\exp^{-2\overline{\Gamma}\tau + \mu_2\tau^2} \tag{2.14}$$

Où B_0 correspond à la ligne de base, A est l'amplitude de la fonction de corrélation à l'intervalle

$\tau = 0$, μ_2 le paramètre de polydispersité.

Lorsque l'analyse des cumulants ne modélise pas la fonction d'autocorrélation mesurée un modèle prenant en compte deux populations de tailles distinctes peut être utilisé.

$$g_2(\tau) - 1 = B_0 + \left(A_1 \exp^{-\Gamma_1 \tau} + A_2 \exp^{-\Gamma_2 \tau}\right)^2 \tag{2.15}$$

$A_{1,2}$ et $\Gamma_{1,2}$ sont respectivement les amplitudes et les taux de décroissances des deux populations.

Par extrapolation linéaire des amplitudes A_1 et A_2 à angle nul ($\theta = 0°$) une estimation du rapport en nombres d'objets de chaque population est possible lorsque les approximations suivantes sont valables :

- Objets denses
- Même indice de réfraction pour les deux populations

Dans ce cas, la relation liant les amplitudes est la suivante :

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{N_1 R_{H_1}^6}{N_2 R_{H_2}^6} \tag{2.16}$$

Où N_1 et N_2 sont les nombres d'objets des deux populations contribuant à l'intensité diffusée, R_{H_1} et R_{H_2} sont les rayons hydrodynamiques des deux populations.

Le goniomètre de la marque Amtec (France) et le corrélateur BT9000 de marque Brookhaven (Etats Unis) sont utilisés pour les mesures. Les solution protéiques sont filtrées par un filtre en ester de cellulose (CME 0.22μm, Karl Roth). Le tube en verre contenant la solution plonge dans le goniomètre, dans un bain de toluène, d'indice de réfraction très proche du verre, thermostaté à 20°C . Un obturateur d'ouverture variable est placé devant le détecteur de photons afin de limiter la lumière parasite. L'ouverture du pinhole est choisie à 1 mm, la puissance du laser est de 50 mW, sa longueur d'onde $\lambda = 532$ nm . La mesure des fluctuations est faite à différents angles θ compris entre 30 et 140°.

2.1.4 Ellipsométrie à extinction

Lorsqu'un faisceau lumineux polarisé linéairement est réfléchi il peut devenir polarisé elliptiquement selon la nature des deux milieux et de l'interface. Réciproquement, il existe une polarisation incidente elliptique pour laquelle le faisceau réfléchi sera polarisé linéairement (fig. 2.6).

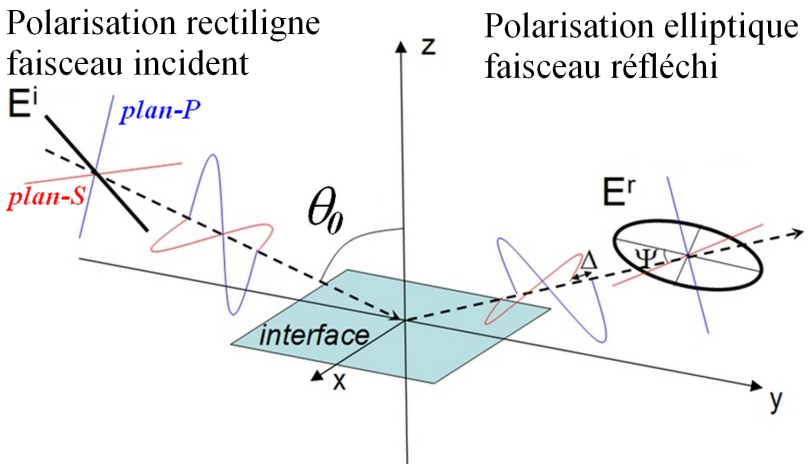


Fig. 2.6: Schéma des angles ellipsométriques mesurables après réflexion, θ_0 est l'angle d'incidence, Δ le déphasage entre la composante P et S du champs électrique, Ψ l'angle entre le plan de l'interface et l'axe majeur de l'ellipse.

L'ellipsomètre à extinction est basé sur ce principe [143]. Le polariseur couplé à un compensateur produit une polarisation elliptique du faisceau incident de manière à ce que sa réflexion par l'interface soit en polarisation rectiligne. Le faisceau peut alors être éteint par l'analyseur. La polarisation elliptique est due au déphasage noté Δ, entre les composantes perpendiculaire et parallèle du champ électrique par rapport au plan d'incidence (fig. 2.6). L'angle entre l'axe majeur de l'ellipse et le plan de la surface réfléchissante est noté Ψ [144].

L'avantage de cette technique est de déterminer les angles ellipsométriques Δ et Ψ par mesure directe (eq. 2.17, 2.18), en utilisant respectivement les angles P et A du polariseur et de l'analyseur par rapport au plan d'incidence (fig. 2.7). A chaque couple (Δ, Ψ) correspondent deux paires d'angles du polariseur et analyseur [145]. Le premier couple (P_1, A_1) est lié aux angles par la relation suivante :

$$\Delta = 2P_1 + 90^\circ \tag{2.17}$$

$$\Psi = A_1 \tag{2.18}$$

Le changement de polarisation est lié aux coefficients de réflexion de l'interface r_p (parallèle au plan d'incidence) et r_s (allemand : senkrecht, perpendiculaire au plan d'incidence) [135]. Les angles ellipsométriques mesurés sont liés aux coefficients de réflexion par la relation suivante [146] :

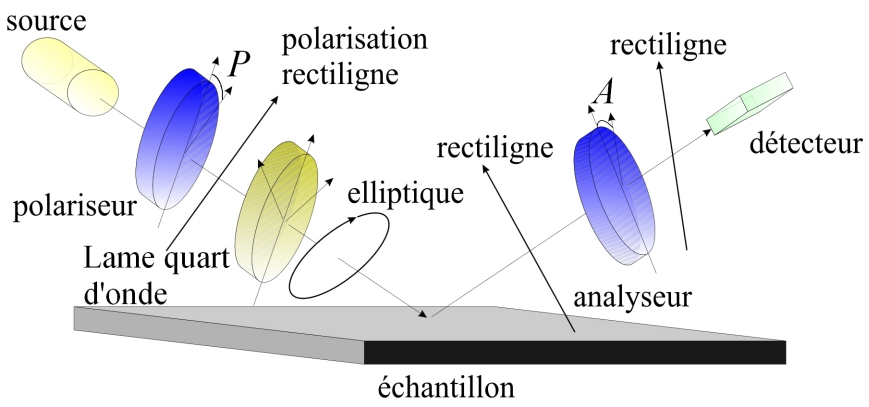


Fig. 2.7: Schéma de principe de l'ellipsomètre à extinction. (Image [143])

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = tan\Psi e^{i\Delta} \tag{2.19}$$

$$\Delta = \arctan\left(\frac{Im(\rho)}{Re(\rho)}\right) \tag{2.20}$$

$$\Psi = \arctan\left(\frac{Re(\rho)}{\cos\left(\arctan\left(\frac{Im(\rho)}{Re(\rho)}\right)\right)}\right) \tag{2.21}$$

Δ et Ψ sont particulièrement sensibles à l'angle d'incidence θ_0 au voisinage de l'angle de Brewster θ_B. Ce dernier est défini comme l'angle d'incidence pour lequel le faisceau réfléchi serait exactement dans la direction du champ électrique du faisceau réfracté. Les faisceaux réfractés et réfléchis formeraient un angle de 90° ce qui permet de calculer aisément θ_B par la relation de Snell-Descartes :

$$n_0 \sin(\theta_0) = n_2 \sin(\theta_2) \tag{2.22}$$

Où n_0 est l'indice du milieu dans lequel se propage la lumière, n_2 l'indice du milieu 2, θ_0 l'angle d'incidence, θ_2 l'angle de réfraction (schéma fig. 2.8). A l'angle de Brewster $\theta_0 = \theta_B$ et $\theta_B + \theta_2 = 90°$, la relation 2.22 donne donc :

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_0}\right) \tag{2.23}$$

En présence d'un film interfacial, le rapport des coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ est dévié par rapport à celui correspondant à une interface vierge. Si le film est optiquement épais, θ_B varie par rapport à celui calculé pour une interface vierge (eq. 2.23). ρ peut être modélisé par un système en couche stratifiée. Le plus simple modèle est la modélisation d'une seule couche

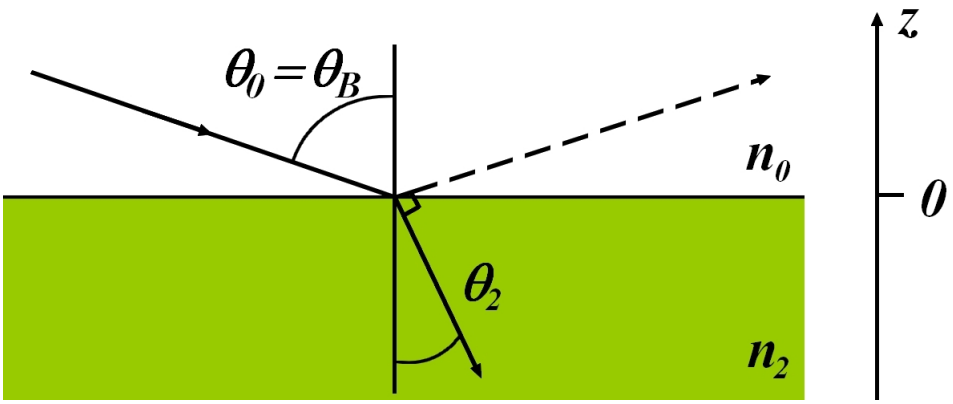


Fig. 2.8: Schéma des paramètres de la relation de Snell Descartes (eq. 2.22) à l'angle d'incidence de Brewster θ_B.

homogène par son épaisseur H et son indice de réfraction n_L [147] prise entre les deux milieux. Dans le cas où θ_B ne varie pas, ρ peut être modélisé par un seul paramètre. Ce paramètre de déviation I_1, vient de la théorie des perturbations [148]. Il permet dans certains cas, d'évaluer la concentration superficielle d'excès Γ qui se définit de la façon suivante :

$$\Gamma = \int_0^{-\infty} (C(z) - C_\infty)\mathrm{d}z + \int_0^{+\infty} C(z)\mathrm{d}z \tag{2.24}$$

Où $C(z)$ est la concentration en protéines en fonction de la hauteur z, $z = 0$ correspond à l'interface, $z < 0$ correspond à la solution de protéines, $z > 0$ correspond à la phase légère (fig. 2.8). La figure

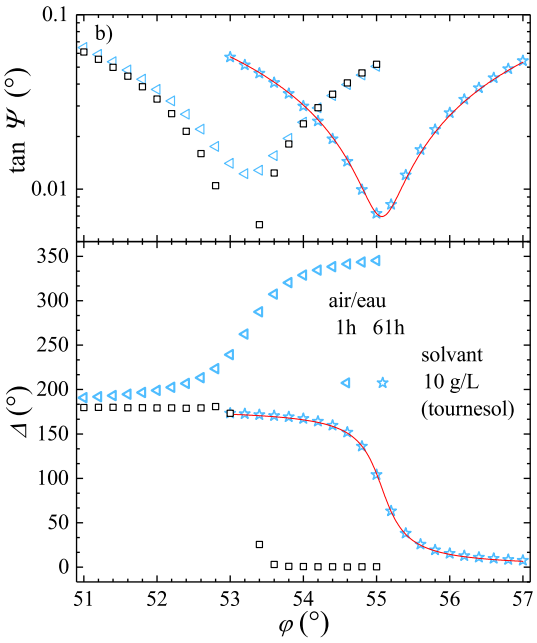


Fig. 2.9: Variation des angles éllipsométriques à l'interface air/eau pour un solvant NaOH (pH 10, carrés), uns solution d'isolat de tournesol à 10 g/L après 1h (triangles vides) et 61 h (étoiles vides).

2.9 montre l'évolution des angles ellipsométriques en fonction de l'angle d'incidence pour le solvant NaOH (carrésvides) et une solution d'isolat de tournesol à 10 g/L après 1h (triangles vides) et 61 h (étoiles vides). L'angle de Brewster correspond à l'angle d'incidence où $\tan\Psi$ est minimum et $\Delta = 90^\circ$ ou 270°. On peut visualiser que au bout de 1 h, pour la solution d'isolat de tournesol, l'angle de brewster est similaire à celui trouvé pour le solvant. On peut donc utiliser la théorie des perturbations pour évaluer la concentration superficielle d'excès. En revanche, lorsque l'âge de la surface est de 61 h, l'angle de Brewster est différent de celui trouvé pour le solvant. Cela indique que le film est trop épais pour être modélisé par la théorie des perturbations. On peut donc utiliser le modèle en couche stratifiées.

2.1.4.1 Modèle en couches stratifiées

Lorsque le film interfacial est suffisamment épais et/ou dense, l'angle de Brewster θ_B varie par rapport à celui calculé par la relation 2.23. On peut alors utiliser la théorie de Huygens-Fresnel [147] pour modéliser le rapport ρ des coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence (eq. 2.19). Ce modèle contient deux paramètres libres, l'épaisseur H et l'indice de réfraction n_L de l'interface permettant l'ajustement (eq. 2.20 et eq. 2.21) des mesures de Δ et Ψ (eq. 2.17 et eq. 2.18). ρ se modélise ainsi :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{r_{0Lp} + r_{L2p}\exp^{-2i\beta}}{1 + r_{0Lp}r_{L2p}\exp^{-2i\beta}} \frac{1 + r_{0Ls}r_{L2s}\exp^{-2i\beta}}{r_{0Ls} + r_{L2s}\exp^{-2i\beta}} \tag{2.25}$$

Les coefficients de réflexion entre le milieu dans lequel se propage l'onde (milieu 0) et le milieu interfacial (milieu L) sont notés r_{0Lp} pour le coefficient parallèle, r_{0Ls} pour le coefficient perpendiculaire au plan d'incidence. De même, pour le milieu interfacial (milieu L) et le milieu de la phase dense (milieu 2) les coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire sont notés respectivement r_{L2p} et r_{L2s}. Il s'écrivent de la manière suivante :

$$r_{0Lp} = \frac{n_L\cos\theta_0 - n_0\cos\theta_L}{n_L\cos\theta_0 + n_0\cos\theta_L} \tag{2.26}$$

$$r_{0Ls} = \frac{n_0\cos\theta_0 - n_L\cos\theta_L}{n_0\cos\theta_0 + n_L\cos\theta_L} \tag{2.27}$$

$$r_{L2p} = \frac{n_2\cos\theta_L - n_L\cos\theta_2}{n_2\cos\theta_L + n_L\cos\theta_2} \tag{2.28}$$

$$r_{L2s} = \frac{n_L\cos\theta_L - n_2\cos\theta_2}{n_L\cos\theta_L + n_2\cos\theta_2} \tag{2.29}$$

$$\theta_L = \arcsin\left(\frac{n_0\sin(\theta_0)}{n_L}\right) \tag{2.30}$$

$$\theta_2 = \arcsin\left(\frac{n_0 \sin(\theta_0)}{n_2}\right) \tag{2.31}$$

β correspond à l'épaisseur de phase du film interfacial et s'écrit :

$$\beta = 2\pi\frac{H}{\lambda} n_L \cos\theta_L \tag{2.32}$$

λ est la longueur d'onde du faisceau incident, θ_L l'angle de réfraction dans le film interfacial, H et n_L correspondent respectivement à l'épaisseur et à l'indice de réfraction du film interfacial modélisé, θ_0, θ_2, n_0 et n_2 sont respectivement les angles d'incidence et les indices de réfraction des milieux 0 et 2 comme indiqué sur le schéma 2.10.

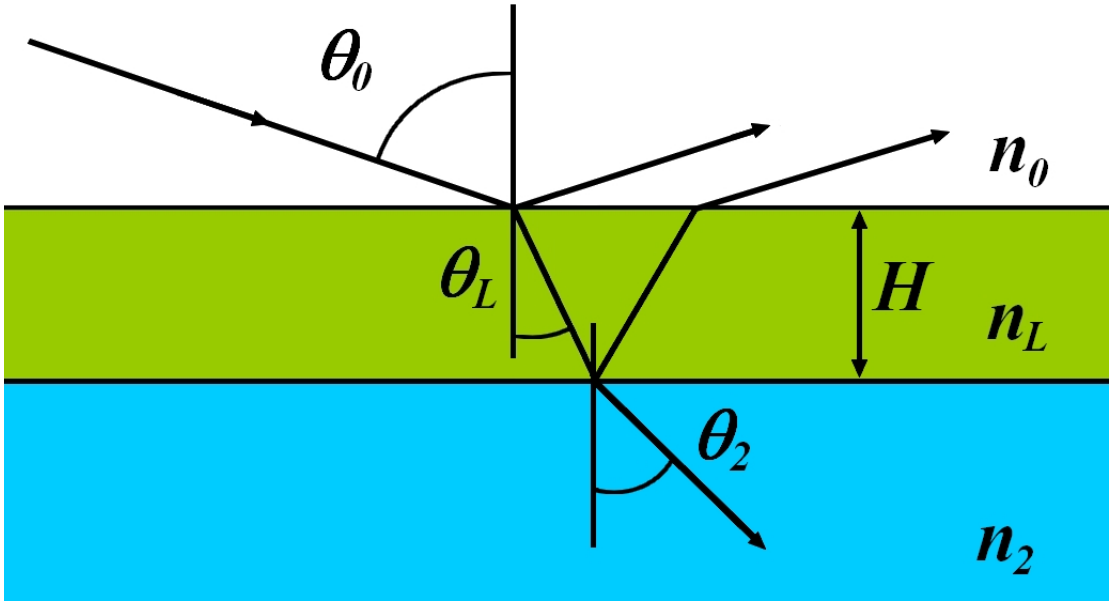


Fig. 2.10: Schéma des paramètres du système considérant le milieu dans lequel se propage l'onde incidente (milieu 0), le milieu interfacial (milieu L), le milieu de la phase dense (milieu 2)

2.1.4.2 Théorie des perturbations

Dans le cas où l'angle de Brewster θ_B ne varie pas avec celui d'une interface vierge on ne peut pas découpler l'épaisseur du film et sa densité lié à son indice de réfraction. Néanmoins $Im(\rho)$ (eq. 2.19) varie et la théorie des perturbations modélise cette variation par un paramètre de déviation par rapport à l'interface vierge, noté I_1. $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ est modélisé de la façon suivante [148] :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{r_{p,0}}{r_{s,0}} + \frac{2iQ_1}{r_{s,0}(Q_0+Q_2)^2}\frac{K}{n_0^2 n_2^2} I_1 \tag{2.33}$$

avec : $Q_0 = \frac{2\pi}{n_0\lambda}\cos\theta_0$, $Q_2 = \frac{2\pi}{n_2\lambda}\cos\theta_2$, $\theta_2 = \arcsin\left(n_0\frac{\sin\theta_0}{n_2}\right)$ et $K = 2\pi\frac{n_0}{\lambda}\sin\theta_0$.

Où $\frac{r_{p,0}}{r_{s,0}}$ est le rapport des coefficients de réflexion d'une interface vierge, I_1 le paramètre de déviation, λ la longueur d'onde du faisceau incident, n_0 l'indice de réfraction du milieu dans lequel se propage l'onde, θ_0 l'angle d'incidence, n_2 l'indice de réfraction du milieu 2, θ_2 l'angle de réfraction dans le milieu 2 (fig. 2.8).

I_1 est une quantité liée à l'intégrale du profil optique du film $n_L(z)$ suivant la hauteur z. I_1 est le paramètre de déviation correspondant au film interfacial, il a la dimension d'une longueur. Pour un indice de réfraction du film $n_L(z)$ localement isotrope, I_1 se défini de la façon suivante [149] :

$$I_1 = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{(n_L^2(z) - n_0^2)(n_L^2(z) - n_2^2)}{n_L^2(z)} \mathrm{d}z \tag{2.34}$$

Où $n_L(z)$ est l'indice de réfraction du film interfacial en fonction de la hauteur z, $z = 0$ à l'interface, $z > 0$ dans le milieu 0 et $z < 0$ dans le milieu 2.

Dans la limite des films interfaciaux optiquement peu dense, en considérant que le film est formé principalement dans l'eau, le paramètre de déviation I_1 peut s'écrire de la manière suivante :

$$I_1 = \frac{n_2^2 - n_0^2}{n_2^2} \int_{-\infty}^{+\infty} (n_L^2(z) - n_2^2) \mathrm{d}z \tag{2.35}$$

Afin de prendre en compte les contributions d'une interface vierge (rugosité de l'interface [150]) par rapport au cas parfait on introduit le paramètre de déviation I_0 correspondant à la mesure solvant/air tel que :

$$I_1 - I_0 = \frac{n_2^2 - n_0^2}{n_2^2} \int_{-\infty}^{+\infty} [n_L^2(z) - n_{L,0}^2(z)] \mathrm{d}z \tag{2.36}$$

Pour calculer la concentration superficielle d'excès il est nécessaire de faire les approximations suivantes :

- La constante diélectrique ($\varepsilon = n^2$) est supposée linéaire avec la fraction volumique en protéines ϕ_p (approximation des milieux effectifs de Wiener [151]).

- L'indice de réfraction du film interfacial $n_L(z)$ est localement isotrope.

La concentration superficielle d'excès Γ s'écrit alors de la façon suivante [152] :

$$\Gamma = \int_{-\infty}^{+\infty} [n_L^2(z) - n_{L,0}^2(z)]\mathrm{d}z \left(\frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}\right)^{-1} \tag{2.37}$$

$$\Gamma = \frac{n_2^2}{n_2^2 - n_0^2}(I_1 - I_0)\left(\frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}\right)^{-1} \tag{2.38}$$

Γ est la concentration superficielle d'excès (eq. 2.24), I_0 le paramètre de déviation de l'interface due au solvant par rapport à l'interface vierge, I_1 le paramètre de déviation de l'interface due à une solution protéique par rapport à l'interface vierge, $\frac{\partial n^2}{\partial \phi_p}$ est évalué expérimentalement (section. 2.1.1).

La partie imaginaire de $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ permet de calculer le paramètre de déviation I_1 [153] :

$$Im(\rho) = \frac{\pi\sqrt{n_0^2 + n_2^2}}{\lambda(n_0^2 - n_2^2)} I_1 \tag{2.39}$$

Où $Im(\rho) = Im\left(\frac{r_p}{r_s}\right) = \tan\Psi \sin\Delta$ (eq. 2.19).

2.1.4.3 Protocoles de mesures

L'ellipsomètre à extinction de la marque Optrel (Allemagne) est utilisé avec un Laser de longueur d'onde λ = 532 nm.

A l'interface air/eau, les protéines de blé (les gliadines) et de tournesol (globulines et albumines) sont étudiées. Le laser est utilisé à une puissance de 20mW. Les mesures sont effectuées dans une boîte de pétri de 17 cm de diamètre. Cela permet de mettre en parallèle la mesure de tension de surface et la mesure ellipsométrique sans perturbation de l'une sur l'autre. Pour les gliadines on considère que le temps initial de la formation du film, t_0, correspond au moment où la solution de protéines s'étale dans la boîte de pétri. Pour l'isolat de tournesol, la surface est formée puis lavée par aspiration avec un embout en téflon. On considère dans ce cas que t_0 correspond à la fin du lavage de surface. Les boîtes de pétris sont recouvertes par du film alimentaire afin de limiter l'évaporation, les flux d'air et le dépôt de poussière à l'interface. Des ouvertures sont incisées dans le film alimentaire afin de permettre la mesure ellipsométrique en parallèle de la mesure de tension de surface (fig. 2.11).

A l'interface hexadecane/eau, seul l'isolat de tournesol est étudié. Le laser est utilisé à une puissance de 100 mW. La température est mesurée sous la réflexion du laser, dans la solution protéique, l'élévation de température est de 0.4° après 1 h soit une variation de l'indice de réfraction de l'eau de 4.10^{-6} [154], négligeable devant les variations d'indice de réfraction du film interfacial (compris entre 10^{-3} et 10^{-1}). Deux guides d'ondes sont placés de manière à ce que le faisceau laser incident et réfléchi traverse perpendiculairement l'interface air/hexadecane (fig. 2.12).
L'hexadecane est placé en premier dans la boîte de pétri puis la solution protéique est délicatement

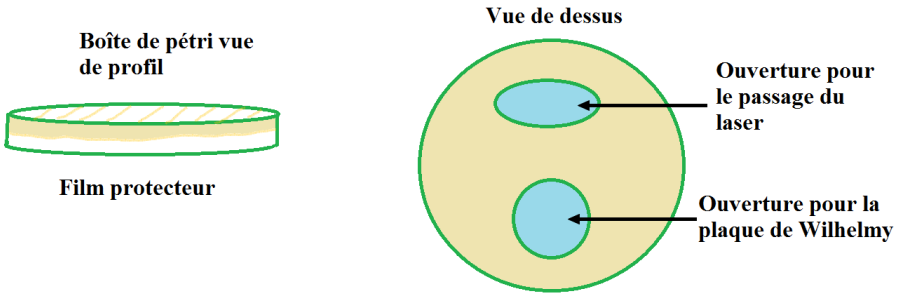


Fig. 2.11: Schéma de la boîte de pétri de diamètre 17 cm avec la mesure ellipsométrique en parallèle de la mesure de pression de surface.

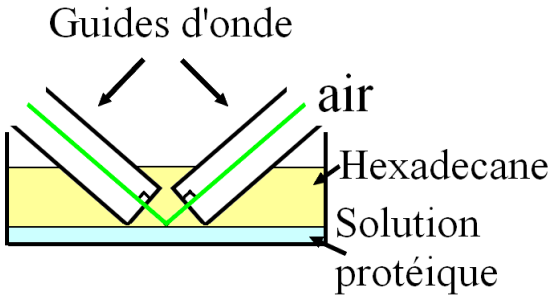


Fig. 2.12: Schéma de la mesure ellipsométrique à l'interface hexadecane/eau avec les guides d'ondes

versée de manière à former le moins de bulles et gouttes possible. L'interface hexadecane/eau est aspirée manuellement avec une seringue en verre ayant un embout en acier pour limité la pollution de la solution, t_0 correspond à la fin du lavage de surface.

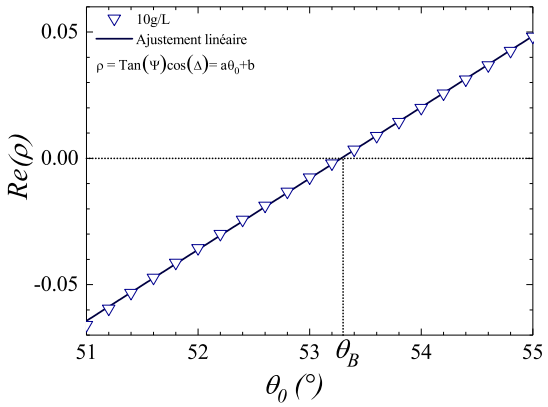


Fig. 2.13: $Re(\rho)$ en fonction de l'angle d'incidence, pour l'isolat de tournesol pur à 85% à 10 g/L dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM, à l'interface air/eau.

L'angle de Brewster θ_B est déterminé par la mesure de Δ et Ψ en fonction de l'angle d'incidence θ_0 comme le montre la figure 2.13. L'angle de Brewster théorique de l'interface vierge est calculé par la relation de Snell-Descartes (eq. 2.23) puis les mesures sont effectuées sur l'intervalle $\theta_B \pm 3°$ par pas

de 0.2°. La partie réelle de $\frac{r_p}{r_s}$ ($Re\left(\frac{r_p}{r_s}\right) = \tan\Psi\cos\Delta$) forme une droite en fonction de l'angle θ_0 et coupe l'axe des abscisses à l'angle de Brewster θ_B. Les mesures sont effectués pour des films âgés d'au moins 1h. L'incertitude de mesure de l'angle de Brewster est de 0.1°. En modélisant Δ et Ψ (eq. 2.20, 2.21) par le modèle en couche stratifiées (eq. 2.25) on évalue les couples d'épaisseur H et d'indice de réfraction du film interfacial n_L pour lesquels l'angle de Brewster varie de 0.1°. La figure

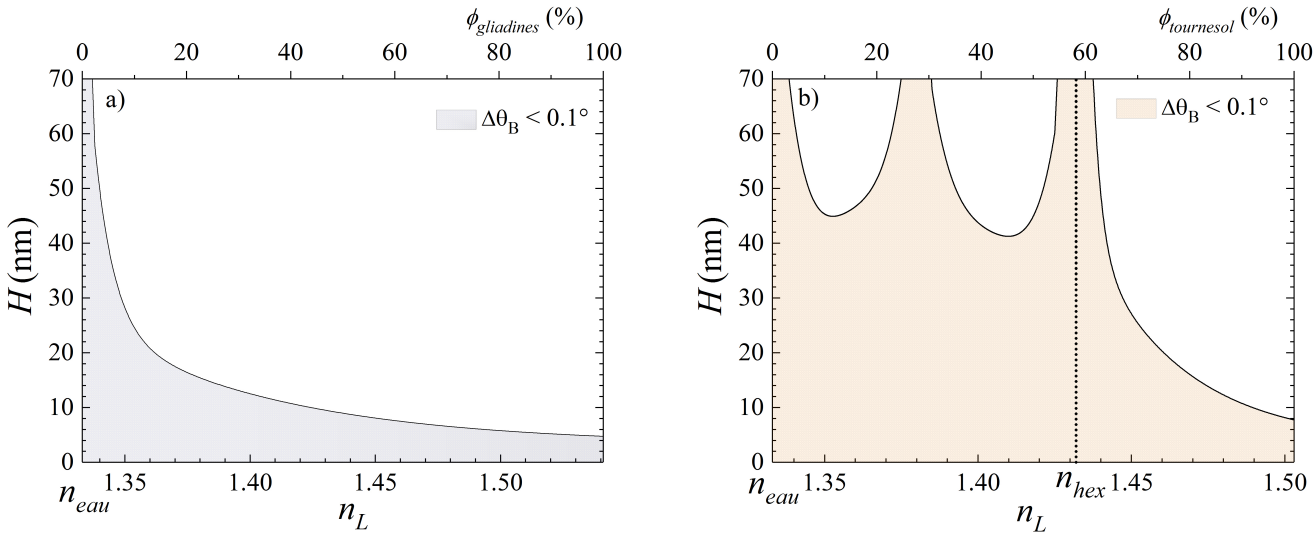


Fig. 2.14: La zone colorée représente les couples (épaisseur H, indice de réfraction interfacial n_L) pour lequel l'angle de Brewster varie de moins de 0.1° avec celui d'une interface vierge à l'interface, en a) à l'interface air/eau (a/e) et en b) à l'interface hexadecane/eau (h/e). L'abscisse du haut correspond à la fraction volumique en gliadines de blé en a) et en isolat de tournesol en b) aux interfaces a/e et h/e respectivement.

2.14 montre les zones des couples (H, n_L) pour lesquelles l'angle de Brewster est dévié de moins de 0.1° avec celui d'une interface vierge. L'axe supérieur donne la fraction protéique dans le film en supposant que le film est entièrement dans l'eau, en a) la fraction en gliadines à l'interface a/e et en b) la fraction en isolat de blé à l'interface h/e. En a) à l'interface a/e les couples (H, n_L) correspondent à un film dense et fin ou épais et peu dense. En b) à l'interface h/e le contraste est plus faible donc les zones des couples (H, n_L) possibles sont plus larges, la non monotonie entre l'indice de réfraction de l'hexadecane et de l'eau vient de la symétrie du contraste optique entre le film interfacial et les deux milieux. ϕ_p est défini par l'équation suivante :

$$\phi_p = \frac{n_L^2 - n_{eau}^2}{n_p^2 - n_{eau}^2} \tag{2.40}$$

Où n_{eau} correspond à l'indice de réfraction de l'eau, n_p correspond à l'indice de réfraction de l'isolat protéique.

Pour les mesures temporelles de $\Delta(t)$ et $\Psi(t)$, l'angle d'incidence est maintenu constant et proche de l'angle de Brewster d'une interface vierge. Pour l'interface air/eau l'angle d'incidence est à 55°

pour un angle de Brewster calculé $\theta_B = 53.12°$. Pour l'interface hexadecane/eau l'angle d'incidence est à 45° pour un angle de Brewster calculé $\theta_B = 42.95°$.

2.1.5 Microscopie à angle de Brewster

Le microscope à angle de Brewster nécessite d'ajouter un objectif grossissant et une caméra sur l'éllipsomètre. Il utilise l'angle de Brewster pour imager une interface. Les inhomogénéités de l'interface se traduisent par une variation locale de l'angle de Brewster permettant une réflexion du signal (fig. 2.15). Si l'image n'est pas contrastée, le film est dit alors homogène à l'échelle d'observation.

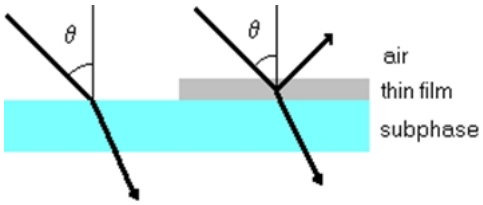


Fig. 2.15: Schéma de principe du microscope à angle de Brewster (BAM).

Le microscope à angle de Brewster de la marque Optrel (Allemagne) est utilisé avec un objectif Mitutoyo 10x dont la distance de travail est de 33.5 mm. L'angle d'incidence est fixé à 55°, l'analyseur est maintenu fixe à 0° du plan d'incidence et le polariseur est positionné de manière à ce que l'intensité du fond de l'image soit la plus faible possible. Les images ont été effectuées à différentes tensions de surface caractéristiques des étapes de formation du film protéique.

La zone visualisée est de 520x390μm avec une résolution de 0.82μm/pxl

2.1.6 Tensiométrie

2.1.6.1 Méthode de la goutte pendante

La tension de surface γ entre deux fluides non miscibles est mesurable par la forme que prend un fluide dans l'autre fluide au bout d'un capillaire. Cette forme lie le poids de la goutte à la tension interfaciale par l'équation de Young-Laplace [155, 156] :

$$\gamma(\frac{1}{R_1}+\frac{1}{R_2}) = \Delta P \equiv \Delta P_0 + \Delta\rho gz \tag{2.41}$$

Où $\frac{1}{R_1}$ et $\frac{1}{R_2}$ correspondent aux courbures principales en un point du contour de la goutte, z correspond à la distance entre une référence plane proche du capillaire et un point du contour de la goutte, $\Delta P = P_{in} - P_{out}$ est la pression de Laplace de part et d'autre de l'interface courbe, $\Delta\rho = \rho_{in} - \rho_{out}$ la différence de masse volumique de part et d'autre de l'interface. La pression de Laplace peut s'écrire en terme de pression de référence ΔP_0 à $z = 0$ et de pression hydrostatique $\Delta\rho gz$ [157].

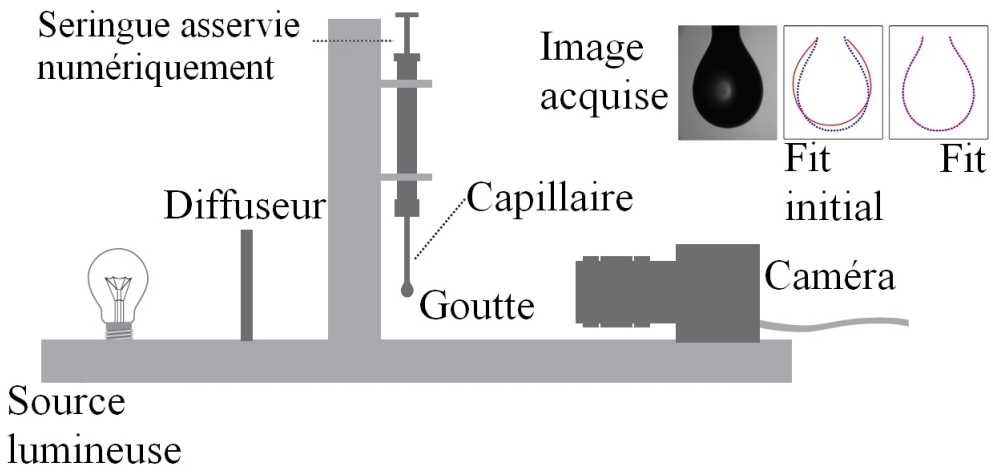


Fig. 2.16: Schéma de principe du tensiomètre à goutte pendante. (Image [157]

Lorsque la goutte est en équilibre les forces capillaires présentes sur tout le contour de la goutte compensent exactement le poids (fig. 2.16). Le tensiomètre à goutte pendante détecte la forme de la goutte et effectue une procédure itérative en ajustant la tension de surface de manière à faire correspondre les formes calculées et détectées [157].

2.1.6.2 Rhéologie interfaciale dilatationnelle

Le tensiomètre à goutte pendante permet d'imposer de faibles oscillations sinusoïdales d'aire interfaciale de pulsation ω [54]. La compression/dilatation imposée produit une réponse en tension

de surface, elle aussi sinusoïdale pour des oscillations de faible amplitude [158]. Lors d'une variation de surface imposée, la mesure d'aire A est faite d'après le contour de la goutte, simultanément à la mesure de tension de surface γ (fig. 2.17).

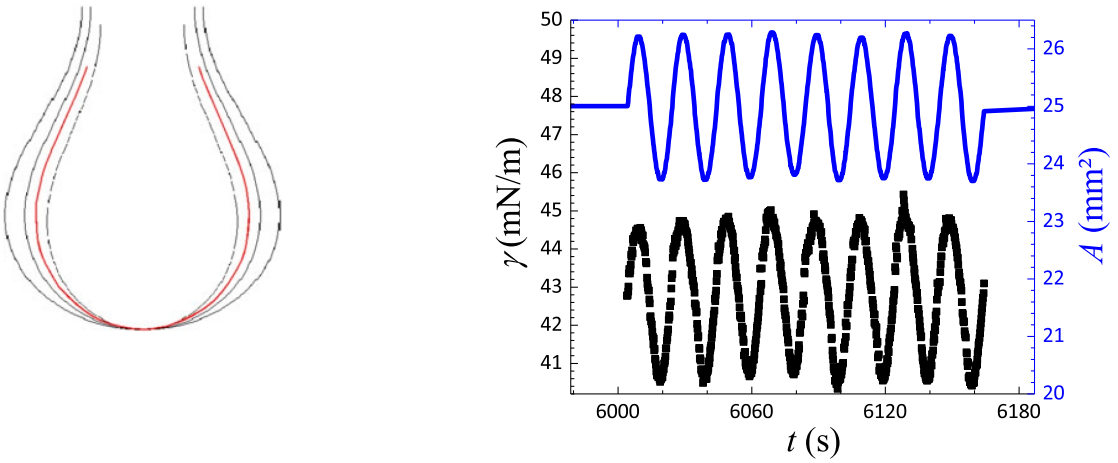


Fig. 2.17: A gauche, schéma de goutte pendante oscillante (Image [158]), à droite, les carrés pleins correspondent à la tension de surface d'une solution de gliadines à 0.25 g/L à l'interface air/eau pendant une variation de surface imposée correspondant au trait plein.

Le module viscoélastique complexe est donné par le rapport des transformées de Fourier des deux sinusoïdes formées par l'aire A et la tension de surface γ [159] :

$$E^*(\omega) = \frac{F[\Delta\gamma(t)]}{F[\Delta \ln A(t)]} \tag{2.42}$$

Où $F[\Delta\gamma(t)]$ est la transformée de Fourrier de la courbe $\Delta\gamma(t) = \gamma(t) - \langle\gamma(t)\rangle_{t_m}$ où $\langle\gamma(t)\rangle_{t_m}$ correspond à la moyenne temporelle de la tension de surface en fonction du temps pendant la durée t_m des oscillations servant à la mesure. $F[\Delta \ln A(t)]$ est la transformée de Fourrier de la courbe $\Delta \ln A(t) = \dfrac{A(t) - \langle A(t)\rangle_{t_m}}{\langle A(t)\rangle_{t_m}}$ où $\langle A(t)\rangle_{t_m}$ est la moyenne temporelle de la surface en fonction du temps pendant la durée t_m des oscillations servant à la mesure.

Le module viscoélastique est composé d'une partie réelle et d'une partie imaginaire décrit de la façon suivante :

$$E' = \| E^*(\omega) \| \cos\varphi = \frac{d\gamma}{d\ln A} \tag{2.43}$$

$$E'' = \| E^*(\omega) \| \sin\varphi = \eta_d \omega \tag{2.44}$$

Où $\| E^*(\omega) \|$ est la norme du module viscoélastique, φ le déphasage entre la déformation imposée et la réponse obtenue, η_d la viscosité interfaciale dilatationnelle.

2.1.6.3 Lavage de la goutte

Afin de vérifier le caractère irréversible de l'adsorption des protéines un double capillaire coaxial est utilisé (fig. 2.18). Il permet de former une goutte puis d'introduire du solvant et de récupérer la solution par petits volumes pour réduire la concentration de protéines dans le volume, tout en gardant la surface formée constante. Afin de déterminer le volume à échanger pour rendre la désorption visible par augmentation de tension de surface, le lavage de la goutte est effectué avec un surfactant dont l'équilibre adsorption/désorption est connu comme le Sodium Dodecyl Dulfate (SDS) [160]. Le SDS est solubilisé dans l'eau à 10 mM. Cette concentration est légèrement supérieure à la concentration micellaire critique (CMC, entre 7 et 10 mM).

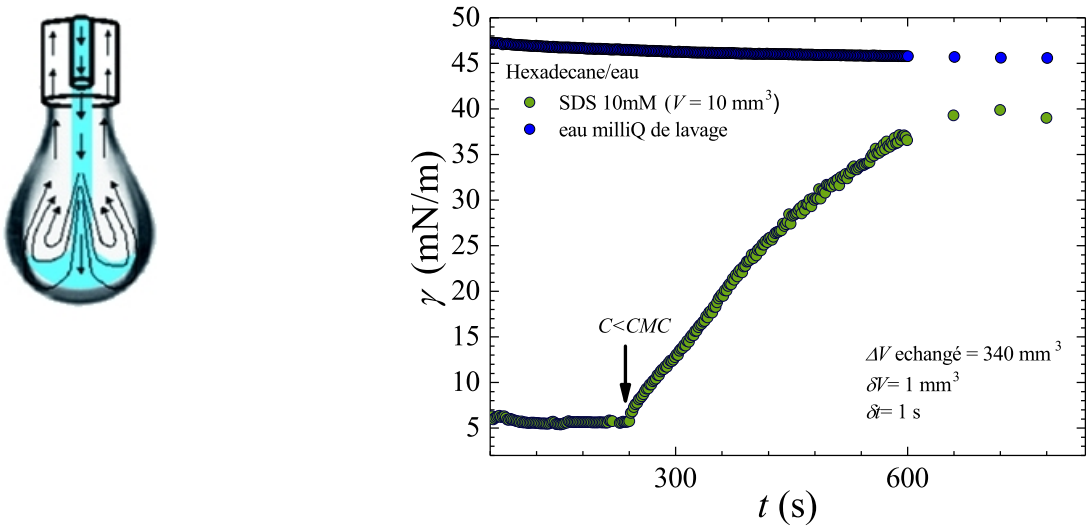


Fig. 2.18: A gauche, schéma du capillaire coaxial (Image [161]), à droite, mesure de $\gamma(t)$ à l'interface hexadecane/eau du SDS à 10mM avec lavage à l'eau milliQ.

La figure 2.18 montre la tension de surface en fonction du temps à l'interface d'une goutte de SDS à 10 mM pendant un lavage à l'eau milliQ. Jusqu'à 235 s le lavage diminue la concentration en surfactant dans le volume de la goutte sans augmenter la tension de surface, indiquant que la concentration en surfactant est supérieure à la CMC. A partir de 235 s la tension de surface augmente, indiquant un équilibre entre la concentration superficielle d'excès Γ et la concentration en volume [162], c'est à dire la réversibilité d'adsorption. A partir de 660 s la tension de surface est constante indiquant que la concentration en tensioactifs à l'interface n'est plus réduite.

Le volume total échangé permettant de réduire la concentration en surfactant, de manière à ce que la tension de surface soit constante, correspond à 30 fois le volume de la goutte, soit 6 fois supérieur à ce qui à pu être fait ailleurs [163, 164]. Ce sera donc le volume utilisé pour considérer que le lavage a effectivement diminué la concentration en volume C.

2.1.6.4 Protocoles de mesures

Pour les mesures utilisant la méthode de la goutte pendante, il s'agit dans tous les cas d'une goutte de solution aqueuse de protéines plongée dans l'autre phase (air ou hexadecane). Pour effectuer les mesures de tension de surface au cours du temps, de rhéologie dilatationnelle interfaciale et de réversibilité, le tensiomètre PAT-1 de la marque Sinterface Technologies (Allemagne) est utilisé.

2.1.6.4.1 Stabilité et propreté de la mesure Le pas de temps minimum ($\simeq$ 120 ms) correspond au temps nécessaire pour la convergence de la procédure itérative avec la forme de la goutte. La stabilité du montage et la propreté de l'appareil permet de mesurer la tension de surface γ pour des temps compris entre 5 et 10000 s après la formation de la goutte.

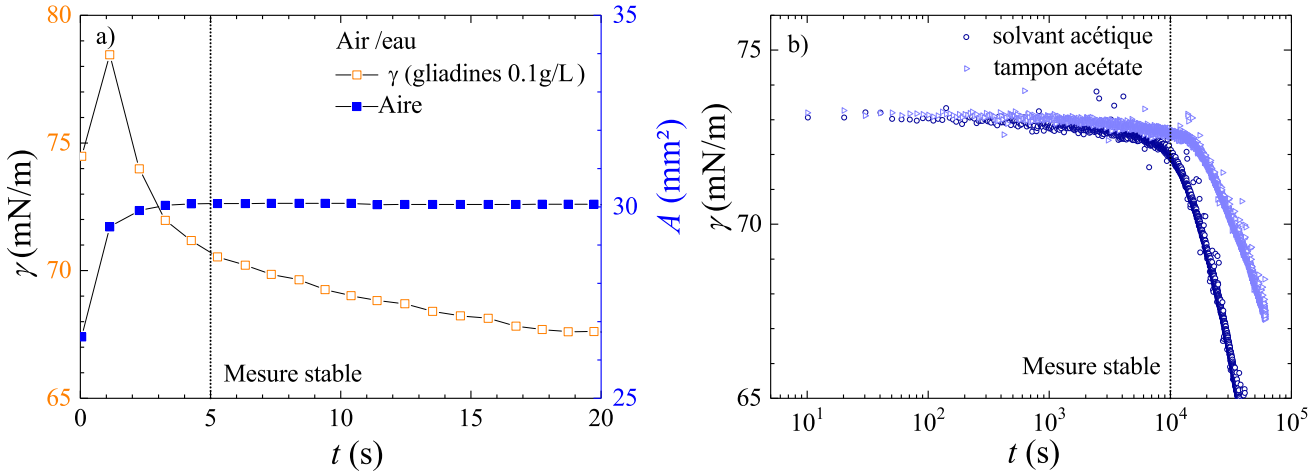


Fig. 2.19: a) Tension de surface en fonction du temps à l'interface air/eau. Les carrés vides correspondent à la tension de surface, les carrés pleins correspondent à l'aire de la goutte.
b) Tension de surface en fonction du temps à l'interface air/eau pour deux solvants acides. Les traits en pointillés montrent la limite de stabilité estimée de la mesure au cours du temps.

La figure 2.19 montre en a) l'évolution de la tension de surface et de la surface de la goutte au cours du temps, immédiatement après le début de la mesure. On considère que la goutte est formée et en équilibre à partir de 5 s. La figure 2.19 montre en b) l'évolution de la tension de surface au cours du temps pour 5 ordres de grandeurs en temps. A partir de 10000 s la surface a piégé suffisamment de composés pour qu'ils aient une influence sur la valeur de tension de surface. On considère donc que nos mesures sont valables jusqu'à 10000 s.

Pour atteindre cette durée de stabilité le protocole de nettoyage suivant est nécessaire :

- Les contenants des solutions, en verre, sont brossés avec du liquide vaisselle classique, lavés à grande eau 30 s après que toute trace de liquide vaisselle soit invisible à l'œil nu puis lavés trois fois à l'eau distillée.

- Les tuyaux du tensiomètre sont lavés par 100 volumes de pompe (1 volume de pompe = 0.1 mL) d'éthanol puis 100 volumes d'eau milliQ.

Préalablement à la formation de la goutte servant à la mesure, 30 volumes de pompe de solvant puis 30 volumes de solution protéique sont injectés puis trois gouttes de solution protéique sont produites, la quatrième est celle de la mesure. Lorsque les mesures sont faites à l'interface air/eau la cellule recueillant les gouttes doit être propre et contenir un fond de solvant afin de réduire l'évaporation pendant la mesure. Afin d'optimiser la mesure il faut utiliser un capillaire qui maximise l'allongement de la goutte [157]. En maximisant la force du poids, les forces capillaires qui le compensent sont calculées plus précisément.

2.1.6.4.2 Domaine de linéarité, rhéologie interfaciale Une vérification de l'étendue du régime linéaire est faite avec les isolats de blé, de tournesol et de colza (fig. 2.20). On vérifie également que les périodes des oscillations imposées soient négligeables devant le temps de relaxation du film. Après un temps nécessaire à la stabilisation de la tension de surface, on impose une déformation oscillante en faisant varier la pulsation ω puis en faisant varier l'amplitude de déformation

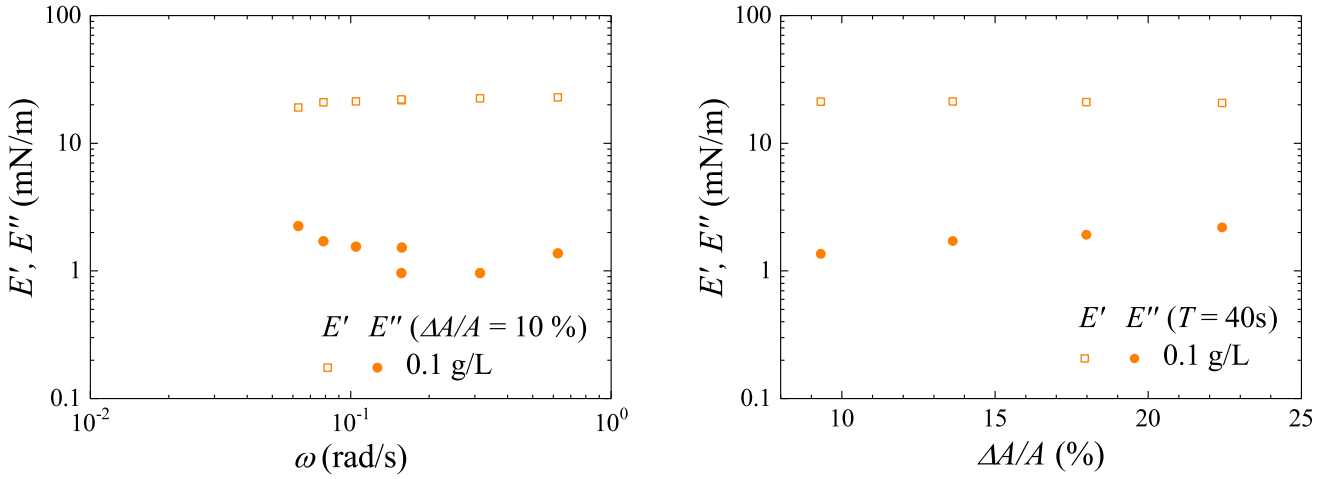


Fig. 2.20: Modules élastiques et visqueux d'un film de gliadines à l'interface air/eau produit par une solution de concentration $C = 0.1$ g/L en fonction de la pulsation à gauche, de l'amplitude de déformation à droite.

La figure 2.20 montre les mesures des modules viscoélastiques pour des pulsations et amplitudes autour des valeurs choisies, $\frac{\Delta A}{A} = 10$ %, ω=0.157 rad/s pour les concentrations en gliadines $C < 0.1$ g/L afin de maximiser le rapport $\frac{signal}{bruit}$ et $\frac{\Delta A}{A} = 5$ %, ω=0.628 rad/s pour les concentrations en gliadines $C \geq 0.1$ g/L. L'amplitude de déformation est bien à l'intérieur du domaine de déformation linéaire et la pulsation est éloignée d'un temps caractéristique du film protéique, on peut donc utiliser les amplitudes et pulsation de 5 %, $\omega = 0.157$ rad/s et 10 %, $\omega = 0.628$ rad/s pour le film de gliadines. Cette vérification est faite également avec l'isolat de tournesol et de colza.

2.1.6.4.3 Lavage de goutte Le SDS est solubilisé dans l'eau à 10 mM. Cette concentration est légèrement supérieure à la concentration micellaire critique (CMC, entre 7 et 10 mM). Pour échanger

un volume $\delta V = 1$ mm^3 le pas de temps utilisé est $\delta t = 1$ s. Cela permet d'observer l'augmentation temporelle $\gamma(t)$ pour un tensioactif s'adsorbant réversiblement, ce sera donc les paramètres utilisés pour le lavage de solutions de protéines. Le volume total échangé au cours du lavage est $V_{tot} = 340$ mm^3, le volume de la goutte est $V_{goutte} = 10$ mm^3.

2.1.6.4.4 Mesure dynamique de tension de surface Un capillaire de diamètre 3 mm est utilisé avec les protéines de blé. Pour les mesures cinétiques, la surface de la goutte est gardée constante $A = 25$ mm^2 nécessitant un volume proche de $V = 15$ mm^3 selon la tension de surface. Pour les mesures de rhéologie dilatationnelle deux valeurs d'amplitude de déformations et de fréquences sont utilisées de manière à optimiser les mesures. Pour les concentrations inférieures à 0.1 g/L $\frac{\Delta A}{A} = 5$ % à la pulsation $\omega = 0.157$ rad/s et pour $C \geq 0.1$ g/L $\frac{\Delta A}{A} = 10$ % à la pulsation $\omega = 0.628$ rad/s. Pour estimer la réversibilité d'adsorption, la surface est gardée constante à 25 mm^2, le pas d'échange est $\delta V = 1$ mm^3 pour un temps δt=1 s soit 2 s pour retirer puis injecter 1 mm^3.

Un capillaire de 2 mm est utilisé avec les protéines de tournesol et de colza aux interfaces air/eau et hexadecane/eau. La surface imposée est comprise entre 30 et 40 mm^2 et le volume nécessaire est compris entre 26 et 17 mm^3. Pour les mesures de rhéologie dilatationnelle $\frac{\Delta A}{A} = 5\%$, $\omega = 0.628$ rad/s, à l'interface air/eau et hexadecane/eau. Pour la mesure de la réversibilité d'adsorption, la surface est gardée constante à 40 mm^2, le pas d'échange est $\delta V = 1$ mm^3 par pas de $\delta t = 1$ s soit 2 s pour retirer puis injecter 1 mm^3.

2.1.7 Plaque de Wilhelmy

Avec une boîte de pétri de diamètre 17 cm la mesure de tension de surface en parallèle de la mesure ellipsométrique est possible. La plaque de Wilhelmy en platine permet de mesurer la tension de surface d'une interface plane. Les forces capillaires sont alors directement liées à la longueur de la ligne triple entourant la plaque (eq 2.45) par la relation :

$$F = 2(d+w)\gamma\cos(\theta) \tag{2.45}$$

F est la force détectée par le capteur, d et w les dimensions de la plaque, γ la tension de surface et θ l'angle de contact entre la plaque et la phase inférieure.

La plaque de Wilhelmy de la marque KSV NIMA (Suède) est utilisée pour les mesures de tension de surface en parallèle de la mesure des angles ellipsométriques. Lorsque la plaque de Wilhelmy est immergée dans le solvant, la force due au poids de la plaque, la poussée d'Archimède et la tension de surface due au solvant sont prises en compte par ajustement du capteur de force à 0 mN. La plaque

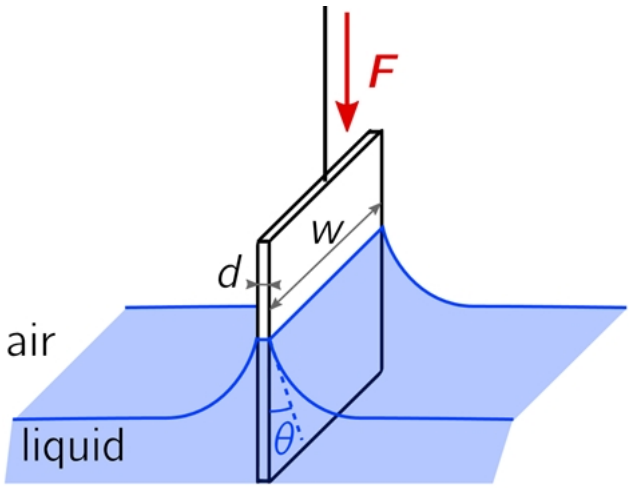


Fig. 2.21: Schéma de principe de la plaque de Wilhelmy. (Image : Vincent Emyde)

de Wilhelmy est alors légèrement immergée dans la solution protéique puis remontée de manière à produire un mouillage total, c'est à dire pour un angle de contact nul $\theta = 0°$.

2.2 Matériels

2.2.1 Composés chimiques

Les produits suivants sont utilisés tels que reçus sans purification supplémentaire :
Acide chlorhydrique, pur à 37 %, VWR
Acide citrique, 99.5 % Carlo Herba
Acide acétique, 99 %, Sigma Aldrich
Dihydrogénophosphate de sodium dodécahydraté, 98.5 %, Sigma Aldrich
Hydrogénophosphate de sodium mono hydraté, 98 %, Sigma Aldrich
Bistrispropane, 99 %, Sigma Aldrich
Carbonate de sodium, 99.8 %, Sigma Aldrich
Hydroxyde de sodium, 98 %, Sigma Aldrich
Dodécylsulfate de sodium, 98.5 %, Sigma Aldrich
Glucono-d-lactone, 99 %, Merk
Hexadecane anhydre, 99%, Sigma Aldrich
Pour connaître la quantité de composés à mettre permettant d'obtenir une solution tampon de force ionique I et de pH fixe, on utilise l'approximation de Henderson-Hasselbalch [165] et l'équation de la force ionique [166] :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \tag{2.46}$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} C_i z_i^2 \tag{2.47}$$

Où le pK_a correspond à la constante d'acidité du composé A, $[A^-]$ la concentration du composé sous forme basique, $[AH]$ la concentration du composé sous forme acide. C_i correspond à la concentration du i^{me} composé ionique contenant le nombre de charges z_i. En imposant la force ionique I et le pH désiré, ce système d'équation permet d'obtenir les concentrations $[AH]$ et $[A^-]$ nécessaire.

Pour les tampons citrate et acétate, On ajoute le composé sous forme acide et l'on fait réagir une partie du composé avec NaOH pour obtenir le rapport $\frac{[A^-]}{[AH]}$ désiré, prenant en compte la force ionique due à l'acide faible et au Na^+ apporté par la base forte. Pour le tampon phosphate on ajoute directement les composés sous forme acide et basique alors que pour les tampons bistrispropane et carbonate on ajoute le composé sous forme basique que l'on neutralise partiellement avec l'acide fort.

L'hexadecane a été utilisé comme huile modèle pour les mesures interfaciales. Afin de garder une tension de surface stable au cours du temps à l'interface hexadecane/eau, un protocole de purification simple et efficace a été développé au laboratoire Charles Coulomb.
La figure 2.22 montre l'évolution de tension de surface à l'interface hexadecane/eau en fonction du temps. La tension de surface décroît au cours du temps pour l'interface hexadecane/eau avec toutes

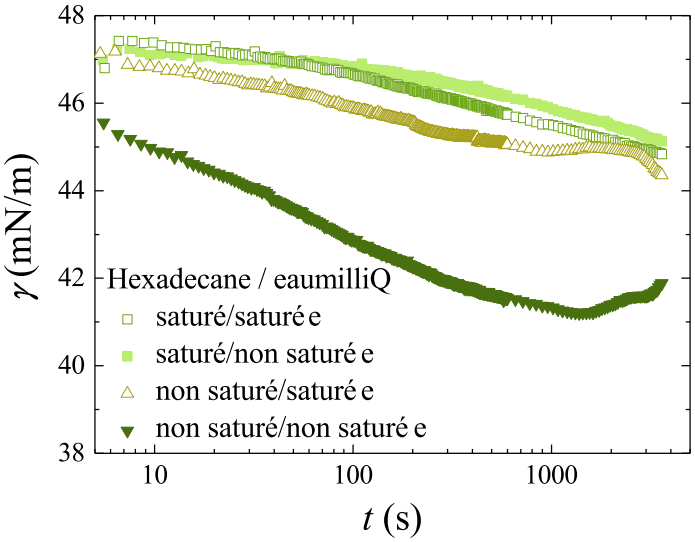


Fig. 2.22: Tension de surface en fonction du temps $\gamma(t)$ de l'interface hexadecane/eau avec saturation ou non d'une phase dans l'autre.

les combinaisons d'équilibre (= de saturation) d'au moins une phase dans l'autre. La courbe ayant la plus forte décroissance correspond à l'interface eau/hexadecane sans équilibre préalable d'une phase dans l'autre. Les courbes de la tension de surface au cours du temps avec une décroissance plus faible correspondent à l'équilibre d'au moins une phase dans l'autre. La saturation d'une phase dans l'autre permet de garder la tension de surface avec une décroissance faible ($\Delta\gamma < 2$ mN/m en 1 h).

Afin de limiter la décroissance de tension de surface au cours du temps pour une interface vierge, on sature l'hexadecane en air et en eau. Le solvant n'est pas préalablement saturé en hexadecane pour éviter l'interaction en solution de l'hexadecane et des zones hydrophobes des protéines. La saturation de l'hexadecane par l'eau milliQ et l'air est faite avec le protocole suivant :

- L'hexadecane est mélangé dans l'eau milliQ pendant 1 h par un agitateur orbital, à raison de 1 volume d'hexadecane pour 3 volumes d'eau milliQ et 1 volume d'air.
- L'hexadecane est ensuite laissé à décanter à température ambiante ($T > 18°$C) pendant 12 h.
- L'eau est ensuite retirée du contenant.

Lors de la préparation des solution protéiques, la concentration C et la fraction volumique ϕ sont calculées de la manière suivante :

$$C = \frac{m_i}{\frac{m_s}{\rho_s} + \frac{m_i}{\rho_i}} \tag{2.48}$$

$$\phi = \frac{C}{\rho} \tag{2.49}$$

Où m_i et ρ_i sont respectivement la masse et la masse volumique de l'isolat, m_s et ρ_s sont respectivement la masse et la masse volumique du solvant. Pour l'isolat de blé $\rho_{gli} = 1320$ kg/m^3 [167] et pour l'isolat de tournesol $\rho_{glob} = 1350$ kg/m^3 [168]. Les solvants sont composés à plus de 99.5 % w/w d'eau, on considère que leur masse volumique correspond à celle de l'eau, $\rho_s = \rho_{eau} = 1000$ kg/m^3).

2.2.2 Gliadines de blé

2.2.2.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions

Les gliadines de blé sont extraites au laboratoire Ingénierie des Agro-polymères et Technologies Emergentes (IATE) en partenariat avec le laboratoire Charles Coulomb (L2C). Les gliadines sont issues de gluten industriel provenant de Tereos Syral (France) et purifiées par le protocole suivant [70] :

- le gluten est mélangé (10 % w/w) à un solvant composé à 50 % v/v d'éthanol et d'eau sur roue d'agitation (19 h à 20°C).

- Après centrifugation (15000 g, 30 min à 25°C) le surnageant est séparé du culot et placé à 4°C pendant 24 h.

- La séparation de phase liquide - liquide permet de récupérer la phase légère qui est immédiatement placée à -18°C avant d'être lyophilisée puis broyée. Cela constitue l'isolat de prolamine de blé avec lequel l'étude a été effectuée.

Le choix du solvant des solutions protéiques est limité par plusieurs contraintes :

- Permettre la solubilisation d'une grande part de l'isolat et exempt de tensioactifs
- Être compatible ou du moins proche d'une utilisation pour la consommation.

Les gliadines ont un point isoélectrique proche de la neutralité, pI $\simeq$ 7 [73] et sont très peu solubles dans l'eau. Afin de maximiser la solubilisation on cherche un solvant dont le pH est suffisamment loin du point isoélectrique tout en étant compatible avec les pH acceptés pour la nutrition humaine (pH 2.5 - 7.5). L'acide acétique est choisi comme solvant.

l'isolat est mélangé à une solution d'acide acétique à 50 mM (pH 3.0) pendant 12 h sur une roue d'agitation à température ambiante. La solution est filtrée avec un filtre en ester de cellulose (CME 0.22 μm, Karl Roth). Afin d'améliorer la reproductibilité des mesures interfaciales, les solutions utilisées pour ces mesures proviennent d'une solution mère à 50 g/L et sont ensuite diluées jusqu'à la concentration voulue. Les solutions de plus fortes concentrations sont préparées directement à la concentration voulue.

2.2.2.2 Composition protéique de l'isolat

La caractérisation de l'isolat protéique consiste ici en une mesure de la distribution de masse par chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide à haute pression (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) et une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) dont les détails sont donnés dans la thèse de Mohsen Dahesh [67].

La colonne de chromatographie est calibrée par des composés de masses connues permettant de lier le temps d'élution à la masse molaire. La détection est faite à 214 nm. L'absorption de ce rayonnement est principalement due aux liaisons amides. Cette détection présente l'avantage d'être très peu sensible au type de protéine puisque les liaisons amides sont présentes entre chaque acide aminé.

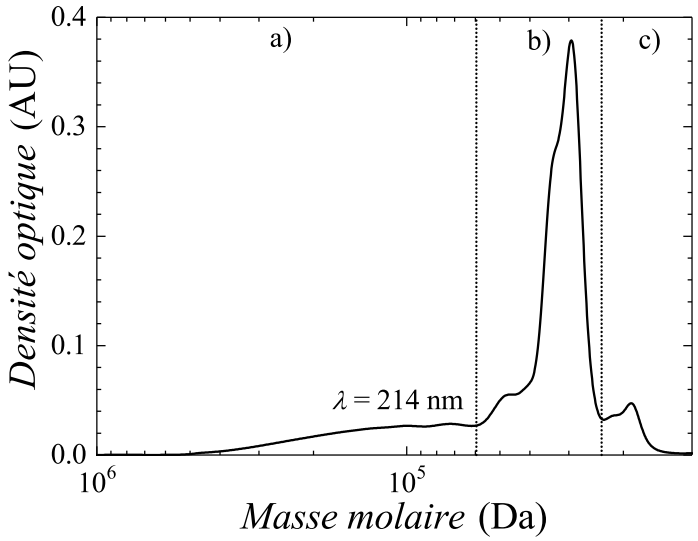


Fig. 2.23: Densité optique de l'isolat de gliadines en fonction de la masse molaire à 214 nm. La zone a) correspond à la distribution des masses molaires des gluténines, la zone b) correspond aux gliadines et la zone c) aux globulines et albumines.

La figure 2.23 montre la distribution des masses molaires présentes dans l'isolat de blé. Par rapport d'aires sous la courbe on peut déterminer la composition de l'isolat qui est composé à 9 % en gluténines (zone a), 84 % en gliadines (zone b) et 7 % en globulines et albumines (zone c). La masse molaire moyenne en masse, de la zone correspondant aux gliadines est 33.3 kDa, on estime la masse molaire de l'isolat protéique à 35 kDa [70, 72]. Dans les 84 % de gliadines, 71 % de gliadines α/β, γ et 13 % de gliadines ωsont présentes [67].

2.2.2.3 Propriétés optiques de l'isolat en solution

Pour modéliser un film interfacial issu de données ellipsométriques il est nécessaire de mesurer l'indice de réfraction des solutions utilisées. On obtient l'indice de réfraction de l'isolat protéique n_P par extrapolation de l'indice de réfraction au carré de la solution de fraction volumique ϕ à $\phi \to 1$ (section 2.1.1). L'indice de réfraction est déterminé dans un solvant d'acide acétique à 50 mM (pH 3.0) pour des fractions volumiques en protéiques ϕ comprises entre 0 et 0.035. L'ajustement linéaire

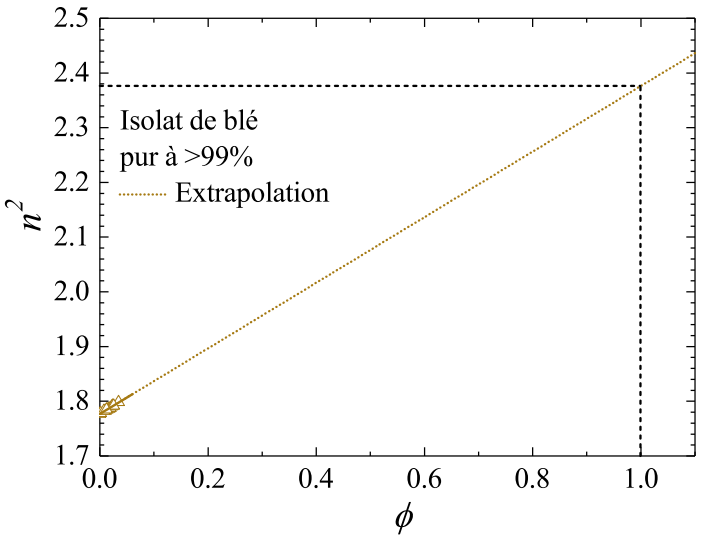


Fig. 2.24: Carré de l'indice de réfraction en fonction de la fraction volumique en gliadines dans le solvant acétique (pH 3.0). Ajusté (trait plein) et extrapoler à $\phi = 1$ (pointillés).

de n^2 en fonction de ϕ a pour pente $\dfrac{\Delta n^2}{\Delta \phi} = 0.599$. Par extrapolation à une fraction volumique $\phi = 1$ on trouve que l'indice de réfraction de l'isolat est $n_{gli} = 1.541$, en accord avec la littérature [169].

2.2.3 Globulines et albumines de tournesol

2.2.3.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions

Les globulines et albumines de tournesol sont extraites au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres) à partir de tourteaux de tournesol industriel.

L'extraction des protéines de tournesol a été réalisée à l'aide d'un réacteur agité d'un litre à 400 rpm. Les quantités appropriées de tourteau et d'eau osmosée ont été ajoutées afin de respecter un ratio de 1/9 w/w (solide/liquide). L'ensemble a été mélangé à température ambiante, pendant 30 min, à pH 7 et en présence de NaCl à 1 M. Une solution de NaOH 1 M a été utilisée pour ajuster et maintenir le pH à 7.

La séparation solide-liquide a été effectuée par centrifugation (Thermoscientific Lynx 6000 centrifuge) à 15000× g et à température ambiante pendant 30 min. La phase aqueuse a été filtrée sur des

filtres plissés en cellulose (Fisherbrand). Au cours de cette étape, les albumines et globulines de tournesol ont été extraites ainsi que les autres composés hydrolsolubles (composés phénoliques libres, oses, osides, acides aminés et peptides libres...).
Ces composés ont été éliminés par un procédé de purification par ultrafiltration. Ce procédé débute par une étape de diafiltration sur un pilote d'ultrafiltration Akta flux 6 (GE Healthcare Life Science) et d'une membrane Millipore de 3 kDa et 0.1 m^2 de surface (Pellicon 2 mini, P2PLBCV01). La pression transmembranaire a été réglée à 1.75 bar et le débit d'alimentation à 1 L/min. 7 diavolumes (DV) ont été réalisés avec de l'eau ultra pure à 0.5 M de NaCl suivis de 3 DV avec de l'eau ultra pure et à pH 10. L'extrait purifié a été stocké à - 80°C avant d'être lyophilisé (Shanghai Pharmaceutical Machinery Co., LTD type GZL-0.5)

Les deux lots d'isolat de tournesol nous sont fournis par le LRGP avec ce protocole d'extraction. La méthode Kjeldhal [170] a été utilisée pour déterminer la pureté en protéines des deux lots. Le lot 1 est pur à 85 % en protéines, les 15 % restants correspondent aux fibres cellulosiques (5 - 10 %), aux polyphénols, avec des traces de NaCl, de NaOH et d'eau. Ce lot a été utilisé pour toute l'étude concernant les protéines de tournesol. Le lot 2 est pur à 91 % en protéines, contient 9 % d'eau et les traces de composés phénoliques représentent moins de 1 %. Ce lot a été utilisé pour l'étude en volume.

Le choix du solvant est, comme pour les gliadines, obtenu suivant plusieurs contraintes :
- Permettre la solubilisation d'une grande part de l'isolat.
- Garder une tension de surface proche de celle de l'eau.

L'isolat de tournesol est mélangé dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10.0) sur roue d'agitation pendant 1 à 5 min. La solution passe ensuite à travers un filtre en ester de cellulose (CME 0.22 μm, Karl Roth). Afin d'améliorer la reproductibilité des mesures interfaciales, les solutions utilisées pour ces mesures proviennent d'une solution mère à 10 g/L et sont ensuite diluées jusqu'à la concentration voulue. Les solutions de plus fortes concentrations sont préparées avec une solution mère à 100 g/L suivant le même protocole.

2.2.3.2 Composition protéique de l'isolat

Les mesures par chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide à haute performance (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) sont effectuées par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres). Pour effectuer la chromatographie l'isolat est dispersé à 5 g/L dans une solution de composition identique à l'éluant :
- eau osmosée 55 % v/v
- acétonitrile 45 % v/v
- acide trifluoroacétique 0.1 % v/v

La détection optique se fait aux longueurs d'onde λ=280 nm et λ=325 nm. L'absorption d'un rayonnement à 280 nm est très élevée pour les protéines contenant des acides aminés ayant un noyau aromatique tel que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Les doubles liaisons carbones présentes dans ces acides aminés ont un fort coefficient d'absorbance à 280nm [171]. L'absorbance de l'isolat peut être lié à la concentration en protéines lorsqu'elles sont le seul composé absorbant à cette longueur d'onde. Les albumines de colza contiennent peu de tryptophanes ce qui contribue à limiter le signal détecté.

La longueur d'onde λ = 325nm est principalement absorbée par les composés phénoliques libres [172]. L'acide chlorogénique et caféique sont naturellement très présents dans la graine de tournesol, lui donnant cette coloration noire [173].

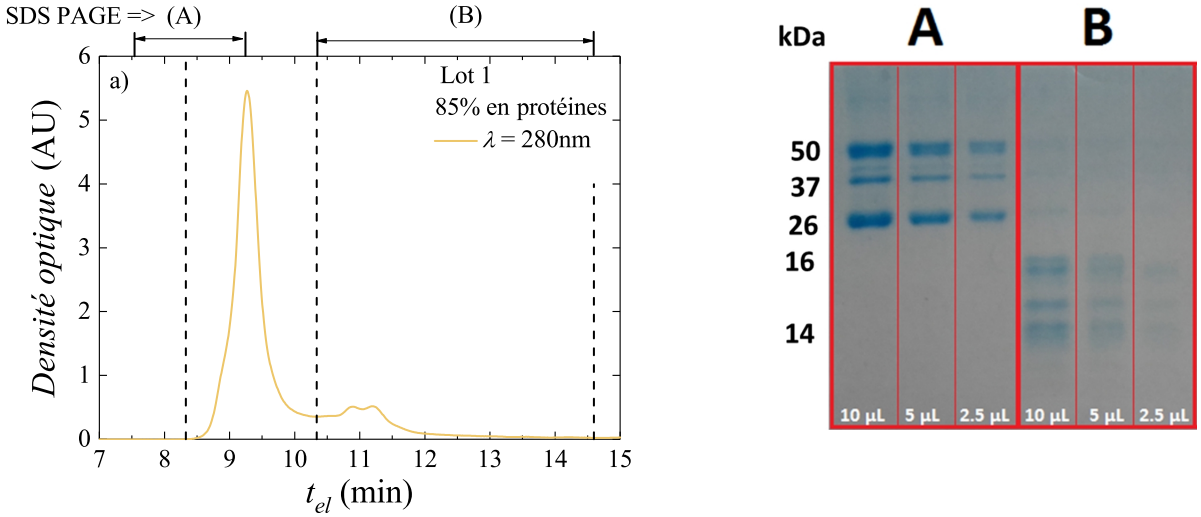


Fig. 2.25: a) Densité optique à 280 nm d'une solution l'isolat de tournesol pur à 85 % en fonction du temps d'élution.
b) Electrophorèse des solutions A et B correspondant aux solutions récoltées aux temps d'élutions des zones A et B du graphique (a) 2.25. les valeurs 10 μL, 5 μL, 2.5 μL correspondent aux volumes de solution utilisés.

La figure 2.25 (a) montre l'HPLC obtenue avec l'isolat de tournesol pur à 85 % sondé à $\lambda = 280$ nm (tryptophane des protéines principalement). Les temps d'élutions des zones A et B correspondent aux temps pour lesquels les solutions A et B sont récupérées pour les mesures de SDS-PAGE (fig. 2.25 (b)). Les traits en pointillés correspondent aux limites des pics correspondant aux globulines et aux albumines. Par rapport d'aires et connaissant la pureté totale en protéines on peut estimer la proportion en globulines et albumines présentes dans l'isolat. Puisque les deux pics se recouvrent légèrement, les rapports d'aires ne donnent qu'une estimation. Pour le lot 1, l'aire correspondant aux globulines est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 8.33$ min jusque t_{el} =10.34 min et l'aire correspondant aux albumines est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 10.34$ min jusque t_{el} =14.60 min. L'isolat pur à 85 % est composé à 68 % en globulines et 17 % en albumines.

Pour confirmer que les pics correspondent aux globulines et albumines de tournesol une mesure de SDS-PAGE est effectuée (fig. 2.25 (b)). La zone A contient des composés de masses molaires qui, d'après la litterature correspondent aux globulines. La masse molaire à 50 kDa correspond au monomère de la globuline de tournesol qui est hexamérique à l'état natif soit 300 kDa, le composé à 37 kDa correspond à la chaîne acide du monomère, le composé à 26 kDa correspond à la chaîne basique du monomère [94, 98, 174]. La zone B contient des composés de masses molaires de 14 à 16 kDa qui d'après la litterature correspondent aux albumines de tournesol [100, 175, 176].

Afin d'estimer le rapport des composés accrochés et libres, une mesure à 325 nm est effectuée pour les deux lot d'isolats de tournesol. Les composés phénoliques accrochés aux protéines et les composés phénoliques libres n'ont pas exactement le même coefficient d'extinction molaire. De plus, le coefficient d'extinction molaire obtenu varie selon la méthode utilisée [172, 177]. le résultat des rapports d'aires est donc une simple estimation puisque nous considérons un coefficient d'extinction molaire constant pour les composés phénoliques accrochés et libres. La figure 2.26 montre l'HPLC

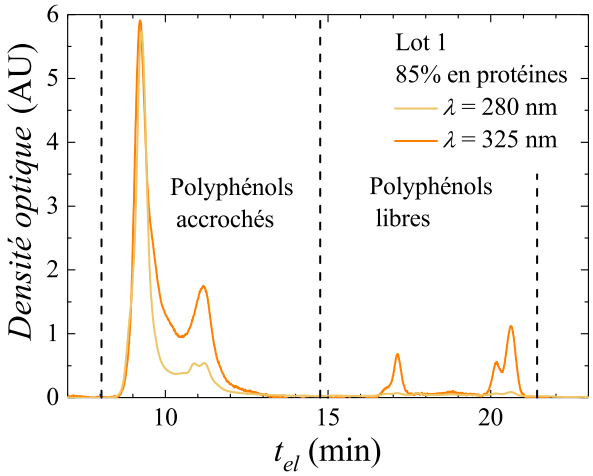


Fig. 2.26: Densité optique à 280 et 325 nm en fonction du temps d'élution.

obtenue avec l'isolat de tournesol pur à 85 % en protéines. L'aire correspondant aux composés phénoliques accrochés est considérée sous la courbe aux temps d'élutions compris entre $t_{el} = 8.04$ min et $t_{el} = 14.76$ min. L'aire correspondant aux composés phénoliques libres est considérée sous la courbe aux temps d'élutions compris entre $t_{el} = 14.76$ min et $t_{el} = 21.42$ min. Le lot 1 comprend 86 % de composés phénoliques accrochés et 14 % de composés phénoliques libres.

2.2.3.3 Propriétés optiques de l'isolat en solution

L'indice de réfraction de l'isolat est déterminé dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10.0) pour des fractions volumiques en protéines ϕ comprises entre 0 et 0.075 (section 2.1.1).

La figure 2.27 montre le carré de l'indice de réfraction en fonction de la fraction volumique en

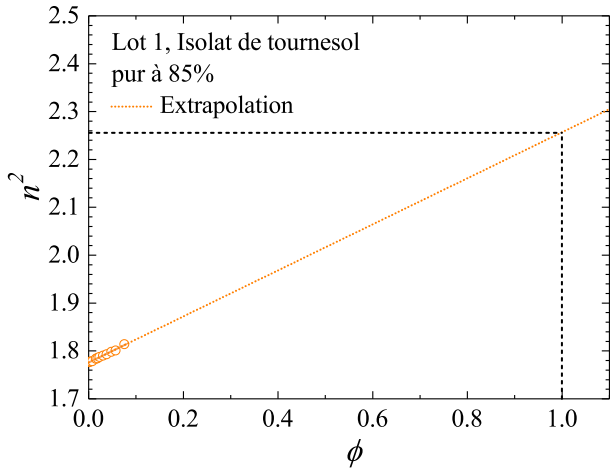


Fig. 2.27: Carré de l'indice de réfraction en fonction de la fraction volumique en isolat à 85 % dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM.

protéines ϕ. L'ajustement linéaire de n^2 (ϕ) a pour pente $\frac{\Delta n^2}{\Delta \phi} = 0.481$. Par extrapolation à la fraction volumique $\phi = 1$ on trouve que l'indice de réfraction de l'isolat est $n_{glob} = 1.503$, cela est en accord avec la littérature [178].

2.2.4 Albumines de colza

2.2.4.1 Purification de l'isolat et préparation des solutions

Les albumines de colza sont extraites au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Mélody Basselin) à partir de tourteaux de colza industriel.

L'extraction des protéines de colza a été effectuée à pH 2, à température ambiante. Les quantités appropriées de tourteau et d'eau osmosée ont été ajoutées afin de respecter un ratio de 1/9 (w/w, solide/liquide). Une solution de HCl à 1 M a été utilisée pour ajuster et maintenir le pH à 2. Après 60 min, la séparation solide-liquide est effectuée par centrifugation à 15000$\times$ g pendant 15 min. La phase aqueuse a été filtrée sur un papier filtre en cellulose (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie, Etats Unis). La phase aqueuse est ensuite clarifiée par microfiltration avec une membrane de surface 55 cm^2 et une taille de pore de 0.22 μm (Pellicon XL menbrane, Millpore, Burlington, Massachusetts, Etats Unis). Le système de microfiltration (Cogent μScale tangential filtration system) provient aussi de Millpore. Un facteur de réduction du volume de 10 a été utilisé. Après microfiltration, l'extrait obtenu est purifié sur un pilote d'ultrafiltration Akta flux 6 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Etats Unis) avec une cartouche à fibres creuses de surface 4800 cm^2 et de taille de pores 3 kDa. La pression transmembranaire a été réglée à 1.5 bar et le débit d'alimentation à 2 L/min, à température ambiante. 5 diavolumes (DV) ont été extraits avec de l'eau salée à 0.5 M de NaCl en maintenant le pH à 2 avec une solution de HCl à 1 M. 4 DV sont extraits avec de l'eau ultra pure.

L'extrait purifié est lyophilisé (Shanghai Pharmaceutical Machinery Co., LTD type GZL-0.5). Ce protocole a été effectué pour le lot à 100 % d'albumines. Pour le lot à 72 % le protocole est simialire mais présente les principales variations suivantes : avant la microfiltration un traitement à 50°C a été effectué et la diafiltration a été effectuée avec de l'eau sous haute pression.

La méthode Kjeldhal [170] a été utilisée pour déterminer la pureté en protéines des deux lots reçus, le premier lot reçu est pur à 72 % en albumines et composé de 10 à 15 % en acide phytique, 5 à 10 % en fibres cellulosiques, 5 % en eau et une faible proportion en composés phénoliques. Le deuxième lot reçu est proche de 100 % de pureté en albumines. le lot à 72 % a été utilisé pour le criblage de conditions physico-chimique permettant la gélification. Les deux lots sont utilisés pour les mesures en tensiométrie.

Pour garder une bonne solubilité avec le lot 1 on choisit de travailler à pH basique. L'acide phytique présent dans le lot 1 acidifie l'eau, donc l'ajout de NaOH en excès est nécessaire pour obtenir le pH souhaité. Pour les mesures en tensiométrie, une solution mère est produite à 10 g/L dans un solvant d'hydroxyde de sodium à 19 mM afin d'obtenir une solution à pH 10.0. La solution mère est filtrée par un filtre en ester de cellulose (CME 0.22 μm) puis diluée dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10.0) pour atteindre les concentrations souhaitées. Une solution mère est préparée avec l'isolat du lot 2 (pureté proche de 100 %) à 10 g/L dans un solvant d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10.0).

2.2.4.2 Composition protéique de l'isolat

Les mesures par chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide à haute performance (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) sont effectuées par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Mélody Basselin). Pour effectuer la chromatographie l'isolat est dispersé à 5 g/L dans une solution à pH 9.0 puis est mélangé à l'éluant :

- eau osmosée 55 % v/v
- acétonitrile 45 % v/v
- acide trifluoroacétique 0.1 % v/v

L'acide sinapique est le composé phénolique le plus présent dans le colza [112, 113], lui donnant une coloration jaunâtre.
La figure 2.28 montre les HPLC obtenus avec l'isolat de colza à 72 %. A 214nm, en a) le pic correspond aux globulines de colza, en b) les pics correspondent aux albumines. A 325 nm, en a) et b) les pics correspondent aux composés phénoliques accrochés aux protéines, en c) les pics correspondent aux composés phénoliques libres. En calculant le rapport d'aires sous les courbes correspondant aux différents composés et connaissant la pureté totale en protéines on peut estimer la proportion en globulines et albumines présentes dans l'isolat et visible à 214 nm. L'aire sous la courbe correspondant aux globulines est considérée aux temps d'élutions $t_{el} = 8.43$ min jusque t_{el} =9.68 min et l'aire correspondant aux albumines est considérée aux temps d'élutions $t_{el} = 9.68$ min jusque t_{el} =16.47 min.

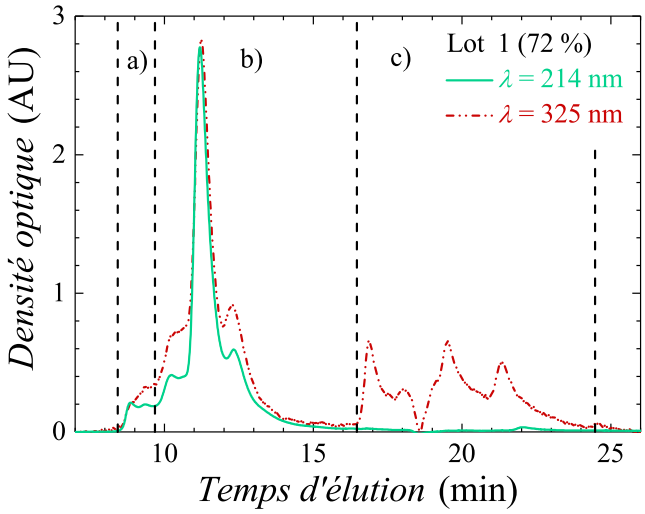


Fig. 2.28: Densité optique en fonction du temps d'élution aux longueurs d'onde 214 et 325 nm. le pic des globulines correspond à la zone a), les pics des albumines sont dans la zone b), la zone c) correspond aux composés phénoliques libres.

L'isolat à 72 % contient 4 % de globulines et 68 % d'albumines. L'aire sous la courbe correspondant aux composés phénoliques accrochés est considérée aux temps d'élutions $t_{el} = 8.43$ min jusque $t_{el} = 16.47$ min et l'aire correspondant aux composés phénoliques libres est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 16.47$ min jusque $t_{el} = 24.47$ min. L'isolat à 72 % comprend 65 % de composés phénoliques accrochés et 35 % de composés phénoliques libres.

3. SOLUBILITÉ, PROPRIÉTÉS EN SOLUTION ET GÉLIFICATION

Le projet de texturation d'huile par protéines végétales a pour ambition de combiner les propriétés fonctionnelles gélifiantes et émulsifiantes des protéines de tournesol et de colza. L'isolat de blé ne faisait pas partie des protéines d'intérêt mais a été étudié dans l'attente de la disponibilité des isolats de tournesol et de colza. C'est pourquoi une caractérisation plus succincte de cet isolat, déjà bien connu dans l'équipe, a été effectuée. Ce chapitre est dédié au propriétés des protéines en solution. Dans un premier temps, on s'intéresse à la solubilité, aux rayons hydrodynamiques des composés en solution et aux températures de dénaturation des protéines d'intérêt. Dans un deuxième temps, on se focalise sur un criblage des conditions physico-chimiques (pH et force ionique) favorisant la gélification par traitement thermique. Les propriétés rhéologiques de la solution d'isolat de tournesol ont été caractérisées pendant le traitement thermique et les premières caractérisations des gels ainsi formés sont présentés. Le criblage des conditions physico-chimiques pour la gélification de l'isolat de colza a conduit à l'observation d'une séparation de phases liquide/liquide dont on a étudié la pertinence en vue d'une purification supplémentaire de l'isolat.

3.1 Isolat de blé

Les rayons hydrodynamiques caractéristiques de l'isolat de blé en solution sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS, section 2.1.3). Un solvant d'acide acétique (50 mM, pH 3) est utilisé pour préparer une solution à 5 g/L d'isolat protéique. Les gliadines de blé ne sont pas solubles dans l'eau pure et l'utilisation d'un solvant compatible avec l'industrie agro-alimentaire a conduit au choix de ce solvant.
La figure 3.1 (a) présente les fonctions d'auto-corrélation $g_2(\tau)-1$ mesurées à différents angles et les ajustements par une double exponentielle qui indique la coexistence de deux populations. La fonction double exponentielle correspond à l'équation suivante :

$$g_2(\tau)-1 = B_0 + \left(A_{rapide}\exp^{-\Gamma_{rapide}\tau} + A_{lent}\exp^{-\Gamma_{lent}\tau}\right)^2 \tag{3.1}$$

Où $A_{rapide,lent}$ et $\Gamma_{rapide,lent}$ sont respectivement les amplitudes et les taux de décroissances des deux populations rapides et lentes, B_0 est la ligne de base, τ est le temps de retard.
Les taux de décroissance issus des ajustements sont présentés en fonction du vecteur d'onde q (fig. 3.1 (b)). Les incertitudes sur les taux de décroissance des populations lentes et rapides correspondent à la déviation standard donnée lors de l'ajustement des courbes. On moyenne l'incertitude relative

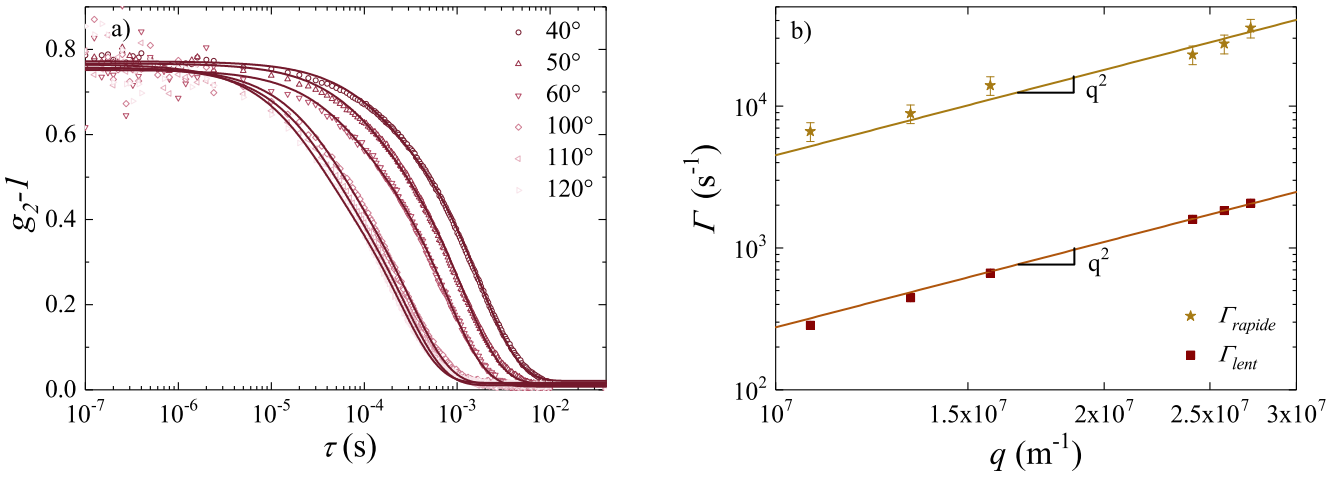


Fig. 3.1: a)Fonction d'auto-corrélation en fonction du retard. Les points expérimentaux sont ajustés (traits pleins) par une double exponentielle (eq. 2.15).
b) Taux de décroissance en fonction du vecteur de diffusion q. Les traits pleins correspondent aux meilleurs ajustements en loi de puissance d'exposant 2.

des taux de décroissance à tous les angles, ce qui donne une incertitude relative de 3 % et 15 % pour les taux de décroissance des populations lentes et rapides, respectivement. Les taux de décroissance augmentent avec q en suivant une loi de puissance d'exposant 2, caractéristique de processus diffusifs. Les préfacteurs des lois de puissances correspondent aux coefficients de diffusion des deux populations (eq. 2.11) et ont pour valeurs $D_{rapide} = 45 \pm 10$ μm^2/s et $D_{lent} = 2.8 \pm 0.2$ μm^2/s. Ces coefficients de diffusion permettent de déterminer des rayons hydrodynamiques par la relation de Stokes-Einstein (eq. 2.12). On obtient $R_{H,rapide} = 5 \pm 1$ nm et $R_{H,lent} = 77 \pm 6$ nm.
D'après la relation 2.16, en faisant l'hypothèse que les deux populations ont le même contraste optique, on peut estimer le rapport en nombre des deux populations. On trouve $\frac{N_{rapide}}{N_{lent}} = 5.5.10^5$ suggérant une très large majorité de petits objets, de rayons hydrodynamique 5 ± 1 nm. Ce rayon hydrodynamique est cohérent avec le rayon de giration des gliadines, 3 nm $< R_g <$ 5 nm, obtenu par mesure de diffusion des rayons X aux petits angles [179]. Les gros objets, sont probablement des assemblages peu denses de gliadines et gluténines [70, 71]. Néanmoins, Pour la suite de l'étude, on considère que les gros objets, très minoritaires, ont un rôle négligeable dans les propriétés interfaciales de l'isolat.

Le rapport $\frac{R_g}{R_H} = 0.9 \pm 0.4$. Pour une sphère dure ce rapport est de 0.775, pour un polymère en solvant θ, $\frac{R_g}{R_H} = 1.2 - 1.3$ [180]. On peut également assimiler le rapport $\frac{R_g}{R_H} = 0.9 \pm 0.4$ à une ellipsoïde avec un rapport des demi axes de 1 à 6 [181]. Dans notre cas, les incertitudes expérimentales ne permettent pas de discriminer l'une de ces possibilités. Dans la littérature les gliadines sont assimilés à des ellipsoïdes avec un rapport des demi axes de 5 à 6 [179].

3.2 Isolat de tournesol

Le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres) nous a fournis deux lots d'isolat de tournesol. Dans la suite de cette partie, seul le premier lot reçu est présenté. Le deuxième lot reçu a fait l'objet d'une caractérisation mentionné en annexe. Ces lots ont été préparés avec le même protocole de purification (section 2.2.3.1). Le lot 1 contient 85 % de protéines. Les 15 % restants impuretés sont des composés phénoliques, des composés cellulosiques, du chlorure de sodium et de l'hydroxyde de sodium résiduel.

3.2.1 Solubilité

La solubilité en fonction du pH a été déterminée au LRGP par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC). L'isolat est dispersé dans de l'eau osmosée à 5g/L et l'ajustement du pH est effectué par ajouts de petits volumes d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium concentré. La solution est agitée 20 min puis filtrée et mise dans l'éluant (voir section 2.2.3.2 pour la composition de l'éluant).

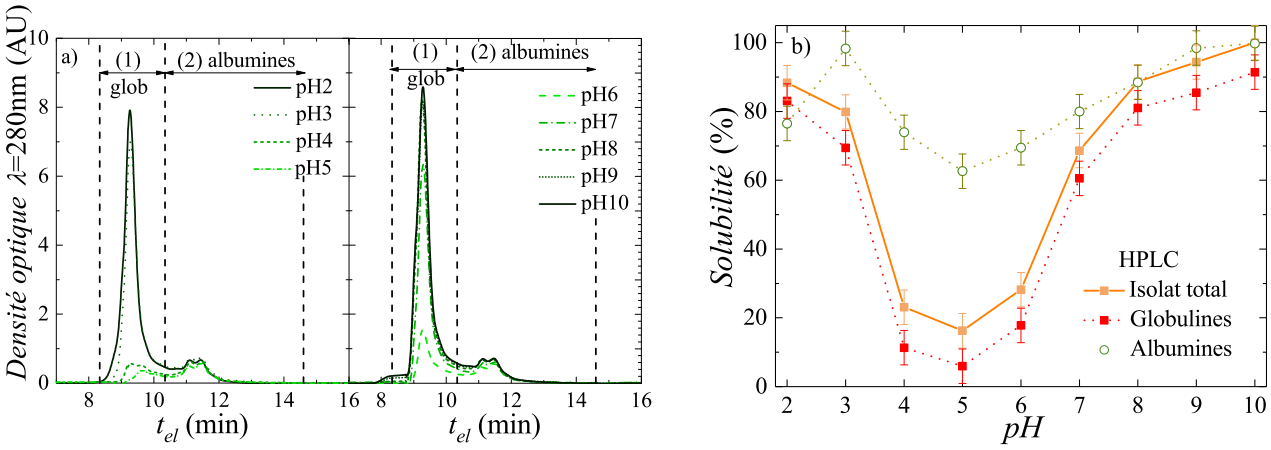


Fig. 3.2: a) Densité optique en fonction du temps d'élution à différents pH. La zone (1) correspond aux globulines, la zone (2) correspond aux albumines.
b) Solubilité en fonction du pH. Le trait plein correspond à l'isolat total, les traits en pointillés correspondent à la solubilité des globulines (carrés pleins) et des albumines (ronds vides).

La figure 3.2 (a) montre la densité optique mesuré à 280 nm en fonction du temps d'élutions de solutions à différents pH. Les traits en pointillés représentent les zones où l'aire sous la courbe correspond aux globulines (1) et aux albumines (2). Le pic correspondant aux globulines est maximal à pH 10, diminue jusqu'à pH 5 puis croît à nouveau jusqu'à pH 2. Le pic correspondant aux albumines est constant sur toute la gamme de pH étudiée avec une faible diminution autour de pH 5. On peut déterminer quantitativement la solubilité de l'isolat total et évaluer la solubilité des globulines et albumines par estimation des rapports d'aires correspondant aux globulines et aux albumines (fig. 3.2 (b)). L'incertitude absolu de mesure issu de la position de la ligne de base est estimé à ± 5 % de solubilité. L'aire sous la courbe obtenue à pH 10 est prise comme aire de référence (correspondant à

100 % de solubilité). A pH 10, la solution d'isolat protéique est composée à 68 % de globulines et 17 % d'albumines.
La figure 3.2 (b) montre la solubilité de l'isolat total, des globulines et des albumines de tournesol avec le pH. Le creux de solubilité pour les globulines est proche de pH 5 et correspond au point isoélectrique (pI $\simeq$ 5.5 [182]). Les albumines sont solubles sur toute la gamme avec un léger creux à pH5 bien que le point iso-électrique soit évalué à pI$\simeq$ 8.8 [103]. Cela indique que la polarité des albumines est suffisante pour les rendre solubles sur toute la gamme de pH.

La solubilité en fonction du pH est également déterminée par spectrométrie-UV (fig. 3.3). Les mesures sont effectuées à 1 g/L dans des solutions tampons de force ionique 0.1 M aux pH 3 (tampon acétate), 5 (tampon citrate), 7 (tampon phosphate), 8 (eau milliQ, l'isolat basifie l'eau (fig. 3.4)) et 10 (tampon carbonate). La figure 3.3 (a) montre les mesures d'absorbance aux différents pH. Le trait

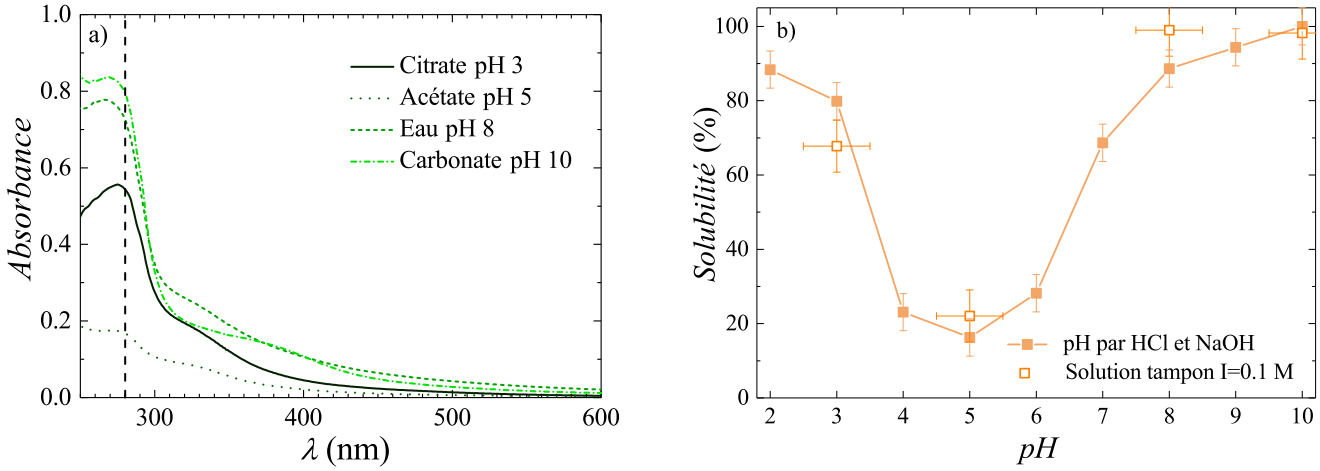


Fig. 3.3: a) Absorbance des solutions à différents pH ($I = 0.1$ M) en fonction de la longueur d'onde. Le trait en pointillés montre la longueur d'onde à 280 nm à laquelle la solubilité est calculée.
b) Solubilité en fonction du pH, avec le pH ajusté par ajout de HCl et NaOH ainsi que dans des solutions tampons $I = 0.1$ M.

vertical en pointillés symbolise la longueur d'onde 280 nm à laquelle l'absorbance est considérée pour calculer la solubilité. A cette longueur d'onde, les doubles liaisons carbone des tryptophanes présents dans les protéines ont une absorption maximale, ce qui permet de détecter une absorbance liée à la quantité de protéines en solution.
La figure 3.3 (b) montre les mesures de solubilité obtenues avec les différents protocoles utilisés. Les mesures concordent pour les deux protocoles.

La figure 3.4 montre le pH d'une solution protéique à différentes concentrations C dans l'eau milliQ. L'isolat augmente le pH de l'eau jusqu'à un plateau à pH 9.5 pour $C \geq 10$ g/L. L'augmentation de pH avec la concentration en isolat est une signature des traces du dernier solvant de purification (hydroxyde de sodium) avant lyophilisation de l'isolat. Afin de garder le pH constant et une solubilité

maximale, le solvant hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10) est choisi pour l'étude interfaciale et pour l'étude des propriétés rhéologique de solutions de tournesol avec une rampe de température imposée.

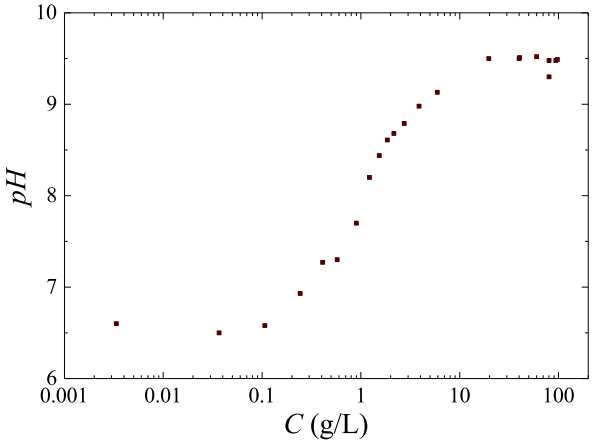


Fig. 3.4: pH de l'eau milliQ en fonction de la concentration en isolat protéique.

3.2.2 Rayons hydrodynamiques

Les rayons hydrodynamiques caractéristiques de l'isolat de tournesol en solution sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS, section 2.1.3). Le solvant hydroxyde de sodium (0.1 mM, pH 10) est utilisé pour préparer une solution à 5 g/L d'isolat protéique en solution. Ce solvant est choisi pour maximiser la solubilité de l'isolat. La figure 3.5 montre les fonctions d'autocorrélation en fonction du retard, à l'angle de détection 80°. Les points expérimentaux sont ajustés par une exponentielle simple (tirets, eq. 2.13), par la méthode des cumulants (pointillés, eq. 2.14) et une double exponentielle (traits pleins, eq. 2.15). Seul la double exponentielle permet d'ajuster correctement les données experimentales, cela indique que les solutions contiennent deux populations ayant un coefficient de diffusion distinct.

La figure 3.6 montre les fonctions d'autocorrélation en fonction du retard, obtenues avec des solutions d'isolat protéiques à 5 g/L (fig. 3.6 (a)) et 10 g/L (fig. 3.6 (b)). Les fonctions d'autocorrélation sont mesurées à différents angles et ajustées par une double exponentielle (eq. 3.1).
La figure 3.7 montre les taux de décroissance obtenus par les ajustements précédents (fig. 3.6) en fonction du vecteur de diffusion q. Les données obtenues avec les solutions à 5 et 10 g/L d'isolat protéique en volume se superposent. Les préfacteurs des ajustements en loi de puissance q^2 correspondent aux coefficients de diffusion. On trouve $D_{rapide} = 35 \pm 5$ μm^2/s et $D_{lent} = 2.8 \pm 0.4$ μm^2/s. Cela correspond aux rayons hydrodynamiques suivants $R_{H,rapide} = 6 \pm 1$ nm et $R_{H,lent} = 77 \pm 10$ nm. Le rayon hydrodynamique obtenu pour la population rapide est dans l'ordre de grandeur de ce qui est mentionné dans la littérature ($R_{H,rapide} = 10$ nm pour un isolat de globulines de tournesol dans l'eau [84]). D'après la relation 2.16, le rapport en nombre des deux populations est de

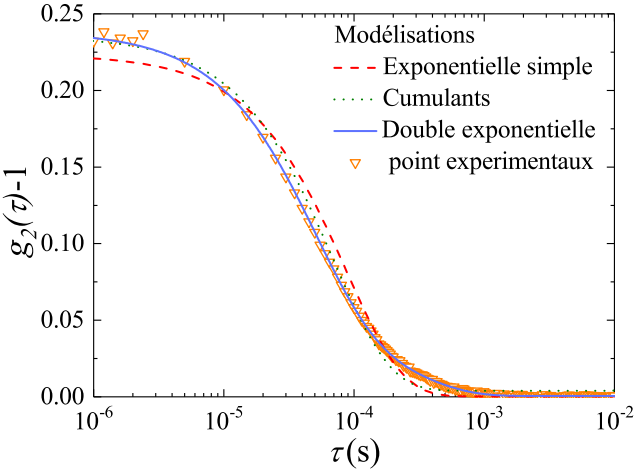


Fig. 3.5: Fonction d'auto-corrélation en fonction du retard, mesuré à 80°. Les points expérimentaux sont ajustés par une exponentielle simple (tirets, eq. 2.13), avec la méthode des cumulants (pointillés, eq. 2.14) et une double exponentielle (traits pleins, eq. 2.15).

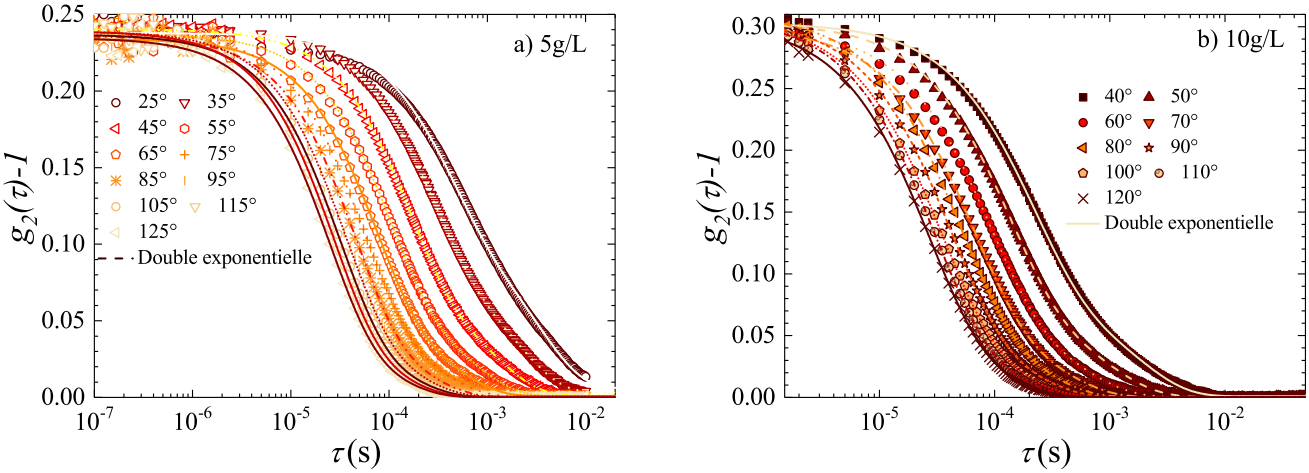


Fig. 3.6: Fonction d'auto-corrélation en fonction du retard. Les points expérimentaux sont ajustés (traits pleins) par une double exponentielle (eq. 2.15), pour des solutions de concentrations 5 g/L (a) et 10 g/L (b).

$\frac{N_{rapide}}{N_{lent}} \simeq 10^6$. La distribution des rayons hydrodynamiques est dominée par le nombre des objets de rayon $R_{H,rapide} = 6 \pm 1$. Ce rayon hydrodynamique est cohérent avec le rayon de giration des globulines, $R_g \simeq 5$ nm, obtenu par SAXS [97]. Pour la suite de l'étude interfaciale, on considère que les gros objets ne sont pas influant du fait de leur diffusion lente et de leur faible proportion en nombre par rapport à la population rapide. De plus, la faible quantité d'albumines présent dans l'isolat de tournesol ne permet pas de les détecter, puisque l'intensité diffusée évolue en R^6 et les albumines de tournesol sont plus petites que les globulines, d'après leur faible poids moléculaires et leur structure rigide (10 à 18 kDa, 4 ponts disulfures intramoléculaires [99, 102]).

Le rapport $\frac{R_g}{R_H} = 0.8 \pm 0.1$ correspond à une forme sphérique [181] ce qui est en accord avec la forme

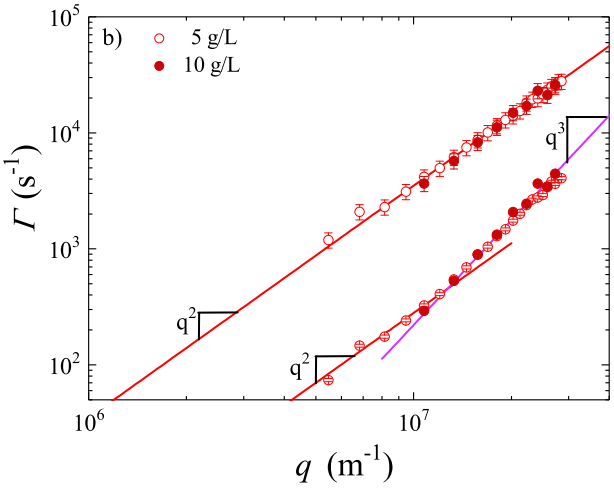


Fig. 3.7: Taux de décroissance Γ en fonction du vecteur d'onde q pour des solutions préparées à différentes concentrations d'isolat protéique.

des globulines hexamériques, globulaires [97]. Le rayon hydrodynamique de la population lente est un ordre de grandeur plus élevé que le rayon de giration des globulines, ce qui suppose un assemblage protéine/protéines et/ou protéine/composés phénoliques. On rappelle que dans l'isolat utilisé, 86 % des composés phénoliques totaux sont accrochés aux protéines. Le principal composé phénolique retrouvé dans les isolats protéiques de tournesol est l'acide chlorogénique mais le détail des composés phénoliques présent dans l'isolat n'est pas connu. Dans la littérature, d'après des mesures de DLS d'une solution d'isolat protéique de tournesol, un rayon hydrodynamique de 10 nm est obtenu alors qu'en présence du principal composé phénolique présent de l'isolat de tournesol, l'acide chlorogénique, la même mesure montre deux rayons hydrodynamiques distincts (14nm et 100nm [84]). Ces valeurs sont dans l'ordre de grandeur de nos mesures. Cela suggère que l'acide chlorogénique participe à l'assemblage correspondant à la population lente $R_{H,lent} = 77 \pm 10$ nm.

Pour la population lente, l'ajustement en loi de puissance d'exposant 2 est valable jusqu'à une valeur limite $q_l = 1.3.10^7$ m^{-1}. On remarque que $\frac{1}{q_l} = 77$ nm, ce qui correspond au rayon hydrodynamique des populations lentes. La fenêtre d'observation dépend de l'inverse du vecteur d'onde de diffusion $\frac{1}{q}$. Lorsque la fenêtre d'observation est similaire à la taille des objets en solution les fluctuations d'intensité dues aux mouvements internes à l'objet s'ajoutent aux fluctuations dues à la diffusion translationelle de l'objet. Pour un polymère en bon solvant, le taux de décroissance s'ajuste en loi de puissance d'exposant 3 [183] comme on peut l'observer (fig. 3.7). Cependant, les mesures correspondant aux populations lentes, obtenues avec l'isoalt de blé, ne s'ajustent pas avec une loi de puissance d'exposant 3. Cela indique que l'assemblage présent dans l'isolat de blé est suffisamment dense pour être optiquement homogène. Par ailleurs, dans la littérature, on trouve que le rayon de giration des gliadines γ en solvant acétique à 1 % (v/v, pH 3.3) est de 2.7 nm alors qu'il est de 3.8 nm en solvant éthanol à 70 % (v/v). Cela indique que les gliadines γ sont en meilleur solvant dans l'éthanol que dans l'acide acétique, ce qui est compatible avec un assemblage compacte en solvant acétique.

Les mesures des coefficients de diffusion des isolats de blé et de tournesol donnent deux populations de rayons hydrodynamique similaires. Dans le cas des populations lentes, On peut suggérer que cela est dû à lié à la filtration, identique pour les deux solutions (0.22 μm, filtre en ester de cellulose). Dans le cas des populations rapides, on peut évaluer la masse volumique apparente des populations rapides d'après leur rayon hydrodynamique et leur masse molaire de chaque espèces en solution. La masse molaire des gliadines de blé est 35 kDa (fig. 2.23) et celle des globulines de tournesol sous forme hexamérique est entre 300 et 350 kDa. On trouve pour l'isolat de blé $\rho = 64$ kg/m^3 et pour l'isolat de tournesol $\rho = 550$ kg/m^3. D'après la littérature, la masse volumique de l'isolat de blé est $\rho_{gli} = 1320$ kg/m^3 [167] et pour l'isolat de tournesol $\rho_{glob} = 1350$ kg/m^3 [168]. Puisque le volume hydrodynamique contient de l'eau, on peut évaluer la fraction volumique d'eau dans le volume hydrodynamique des populations rapide des isolats de blé et de tournesol. Le volume hydrodynamique de l'isolat de blé est composé à 95 % d'eau et l'isolat de tournesol à 59 % d'eau. Cela est compatible avec la structure labile des gliadines [66] et la structure plus compacte des globulines de tournesol hexamériques [97].

3.2.3 Températures de dénaturation

Les globulines de tournesol, comme les globulines d'une large variété de plantes [90], sont hexamériques à l'état natif et ont la capacité de se dissocier avec l'augmentation de température. On parlera ici de température de dissociation car cela inclut la perte de matière ce qui n'est pas le cas de la dénaturation. Afin d'évaluer les températures de dénaturation pour le criblage des conditions physico-chimiques de gélification, les températures de dissociation sont mesurées dans un solvant tampon bistrispropane (BTP, pH 9, $I = 0.1$ M). Pour sonder la présence d'hexamère et de trimère non dénaturé on effectue les mesures également dans un solvant hydroxyde de sodium (NaOH, pH 10, $I = 0.1$ mM). Les mesures sont effectuées par microcalorimétrie (μDSC, section 2.1.2).
La figure 3.8 représente la différence de flux de chaleur ΔQ entre la référence et l'échantillon à 100 g/L en fonction de la température. La variabilité des mesures de ΔQ est due à la différence de masse entre la référence et l'échantillon. Pour le calcul des aires, l'incertitude relative est estimée à 10 % d'après le placement de la ligne de base. Dans le solvant tampon BTP (pH 9, $I = 0.1$ M), on observe deux pics endothermiques. Un pic avec un minimum à 70°C et un pic plus abrupt, avec un minimum à 94°C. Dans le solvant NaOH (I=0.1mM à pH 10), on observe uniquement un pic endothermique avec un minimum à 95°C. L'intégration des courbes de flux de chaleur par le temps permet d'évaluer la quantité de chaleur absorbée par l'échantillon lors des processus de dissociation des protéines. On trouve $\Delta H_1 = 1.3 \pm 0.2$ J/g de protéines, $\Delta H_2 = 9 \pm 1$ J/g de protéines et $\Delta H_3 = 6.4 \pm 0.7$ J/g de protéines.

Le pic à 70°C observé dans le solvant BTP (pH 9, $I = 0.1$ M) correspond à la dissociation de la forme trimérique (7S) en monomères dénaturés (2S), d'après la littérature [93]. alors que les pics à 94°C (BTP, pH 9, $I = 0.1$ M) et 95°C (NaOH, pH 10, $I = 0.1$ mM) correspondent à la dissociation

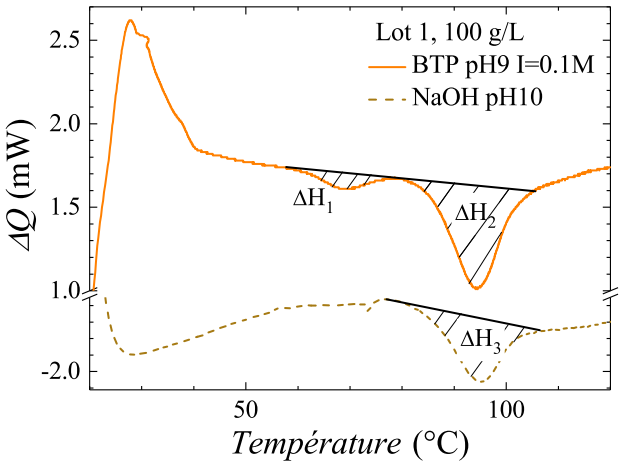


Fig. 3.8: Variation du flux de chaleur ΔQ en fonction de la température, pour une solution à 100 g/L, dans un solvant BTP (pH 9, $I = 0.1$ M, trait plein) et dans un solvant NaOH (pH 10, $I = 0.1$ mM, trait hachuré).

de la forme hexamérique (11S) en monomères dénaturés (2S) [81]. La faible quantité d'albumines de tournesol présentes dans l'isolat ne permet pas d'observer un pic au voisinage de leur température de dénaturation proche de 110°C. L'enthalpie de dissociation des hexamères dans la littérature a été trouvé à 1.7 ± 0.2 J/g de protéines [93] et 12 J/g de protéines [3], dans un tampon borate de pH et force ionique respectives pH 8.5, $I = 0.01$ M et pH 10, $I = 0.05$ M. Cela montre que pour une faible variation de pH et de force ionique l'enthalpie de réaction varie fortement. De plus on peut suggérer l'impact de la méthode de purification plus ou moins dénaturante qui va modifier la proportion de protéines non dénaturées.

Ces mesures ont confirmé la dissociations des protéines de tournesol à partir de 90°C en solvant tampon bistrispropane. On effectuera donc le criblage à cette température de chauffe. De plus, on a pu constater la présence de globulines hexamériques non dissociés et l'absence de trimère non dissocié dans la solution protéique avec NaOH à pH 10, qui sera utilisée pour l'étude interfaciale, l'étude des propriétés rhéologique d'une solution avec rampes de température imposées et qui a été utilisée pour les mesures de diffusion dynamique de la lumière.

3.2.4 Gélification induite par traitement thermique

3.2.4.1 Criblage des conditions physico-chimiques

Afin de déterminer des conditions physico-chimiques requises pour gélifier les solutions protéiques d'isolat de tournesol, on utilise les solvants tampons citrate (pH 3), acétate (pH 5), phosphate (pH 7) et bistrispropane (pH 9) pour préparer des échantillons à 100 g/L. La force ionique des solvants tampons est $I = 0.1$ M, on ajoute du NaCl à ces solvants tampons pour obtenir $I = 0.2, 0.5$ et 1 M. D'après les résultats obtenus par μDSC et la littérature, un chauffage à 90°C est suffisant pour

dénaturer les protéines de tournesol. On choisit donc de chauffer les échantillons à 90°C pendant 1 h afin d'induire une éventuelle gélification des solutions.

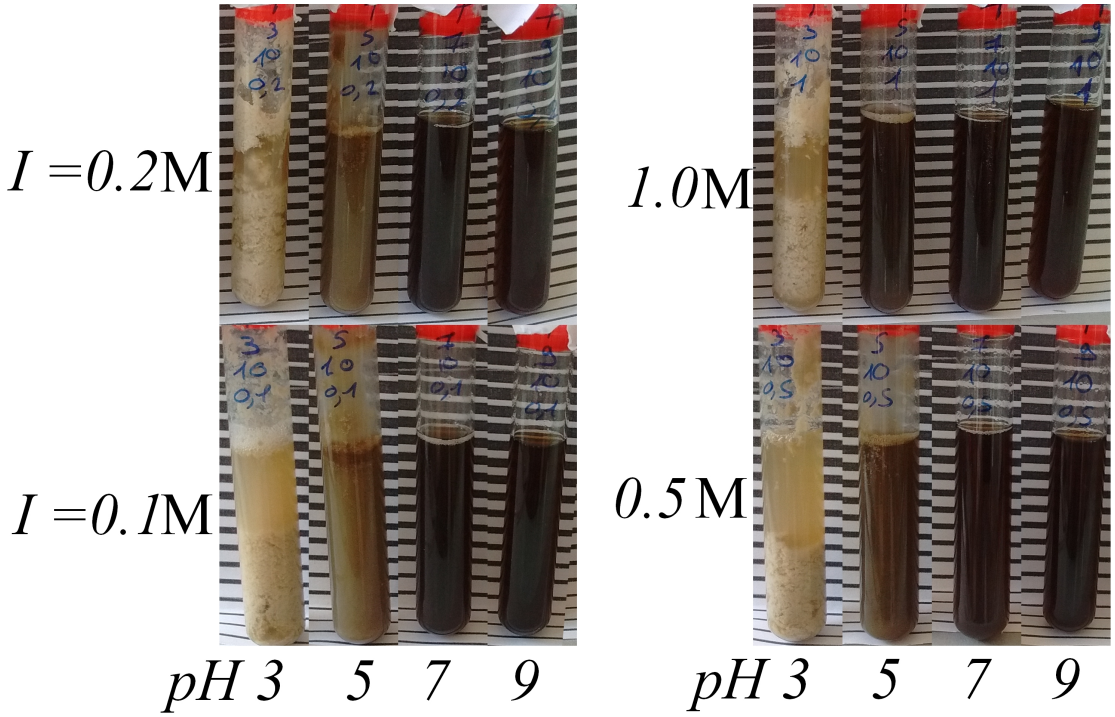


Fig. 3.9: Images des échantillons d'isolat protéique à 100 g/L dans différentes solutions tampons, citrate (pH 3), acétate (pH 5), phosphate (pH 7) et bistrispropane (pH 9), et à différentes forces ioniques $I = 0.1$, 0.2, 0.5 et 1 M.

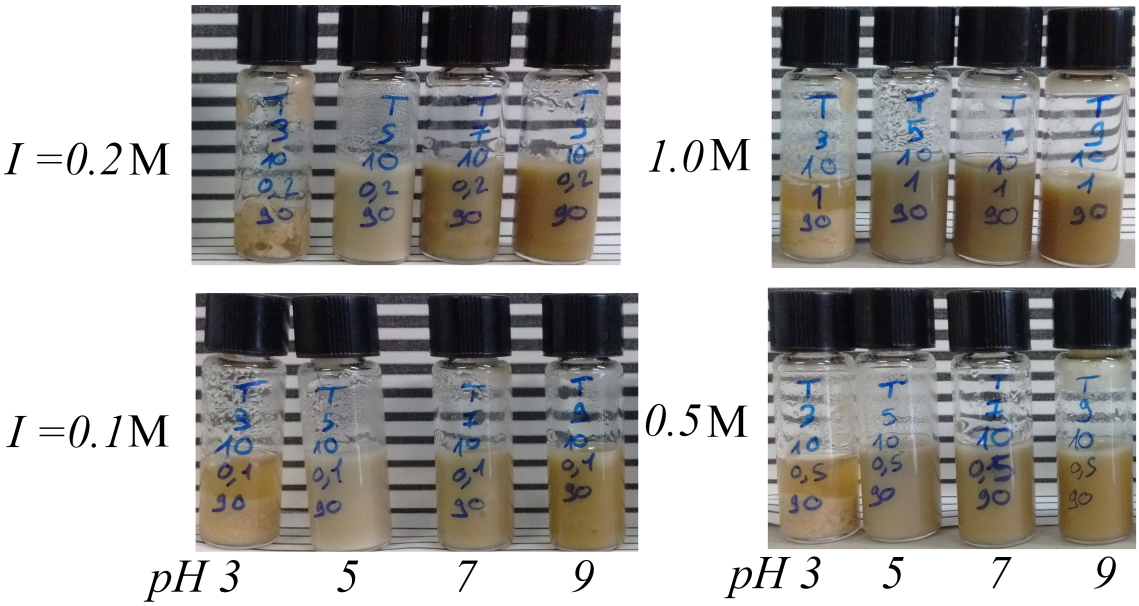


Fig. 3.10: Image des échantillons d'isolat protéique montré à la figure 3.9, après traitement thermique à 90°C pendant 1 h.

La figure 3.9 montre l'aspect des différents échantillons, en fonction du pH et de la force ionique.

Pour les solutions à pH 7 et 9 la solution est marron foncée mais reste transparente sans effet de la force ionique dans la gamme observée. Dans le solvant tampon acétate (pH 5), l'isolat se disperse en rendant la solution turbide mais la turbidité diminue avec l'augmentation de la force ionique. Dans le solvant tampon citrate (pH 3), l'isolat ne se disperse pas et s'agrège, sans variation visible avec la force ionique. La coloration dans le solvant tampon citrate est très faible par rapport à la coloration des autres solutions. Cette faible coloration est probablement due à la protonation des polyphénols. D'une manière générale, l'acide chlorogénique ($pKa = 2.7$) est le composé phénolique majoritairement présent dans les isolats de tournesol mais dans notre cas, le détail de la composition phénolique dans l'isolat n'est pas connu. La turbidité des échantillons est en accord avec la solubilité des globulines, plus solubles à pH basique et force ionique élevée. La figure 3.10 montre l'aspect des solutions après traitement thermique à 90°C pendant 1 h. Les solutions ont toutes gélifié, excepté l'isolat non dispersé dans le tampon citrate.
Le cliché de microscopie optique d'un gel (fig. 3.11) issu d'une solution à 100 g/L dans le solvant tampon BTP (pH 9, $I = 0.1$ M) montre une structure d'agrégats dont la taille caractéristique est de l'ordre du μm.

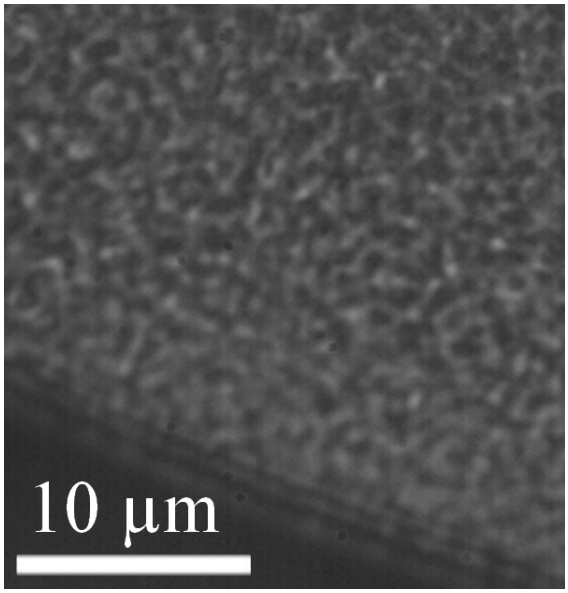


Fig. 3.11: Cliché de microscopie optique d'un gel formé à partir d'une solution à 100 g/L dans le solvant tampon BTP (pH 9, $I = 0.1$ M).

Qualitativement, on observe que les gels sont plus friables à force ionique croissante et à pH acide. Lorsque l'on casse le gel avec une aiguille, on remarque un relargage de solvant. Le gel résistant le plus à l'enfoncement de l'aiguille est obtenu dans le tampon bistrispropane ($I = 0.1M$, $pH = 9$) sans ajout de NaCl. Par la suite, on utilise ce solvant pour évaluer la concentration de gélification minimale et le module de compression du gel.

La concentration critique de gélification est évaluée en retournant les échantillons après traitement thermique. Le relargage de solution lorsque l'échantillon est retourné après traitement thermique indique que la concentration minimale de gélification n'est pas atteinte. On effectue des solutions

d'isolat à 10, 40 et 70 g/L dans le solvant BTP (pH 9, $I = 0.1$ M). Après le traitement thermique, les contenants sont retournés (fig. 3.12). L'échantillon à 10 g/L a relargué du solvant en étant retourné, contrairement aux échantillons préparés à plus forte concentration d'isolat. La concentration critique de gélification apparaît dans l'intervalle $C =]10, 40]$ g/L. Pour évaluer la compressibilité des gels issus des solutions de concentrations 40, 70 et 100 g/L, on mesure le volume de gel avant et après centrifugation à 1700g pendant 30min, (fig. 3.13).

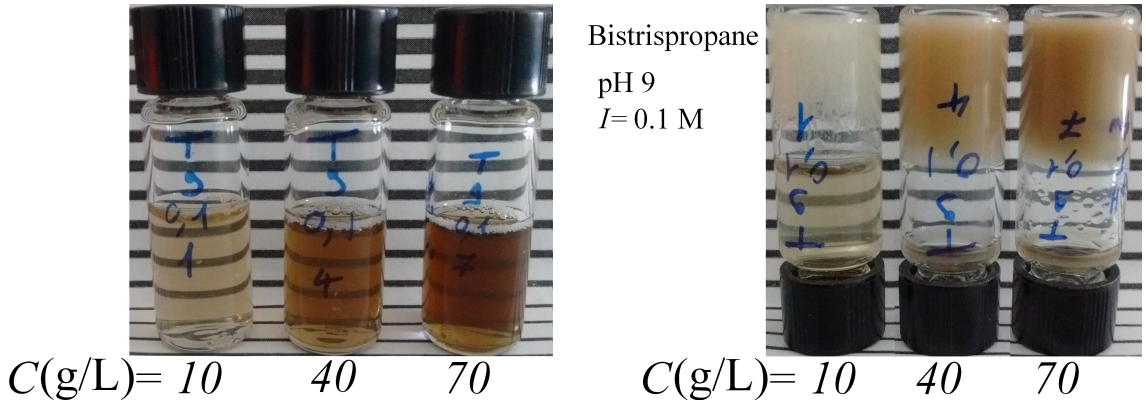


Fig. 3.12: Observation des solutions d'isolat protéique à concentration variable avant (gauche) et après (droite) 1 h dans une étuve à 90°C. (Solvant bistrispropane, pH 9, $I = 0.1$ M)

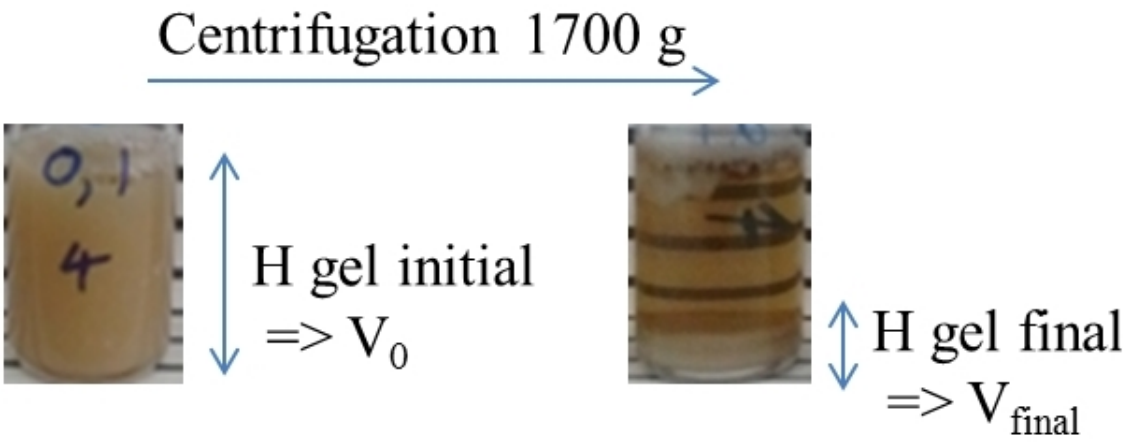


Fig. 3.13: Image d'un gel d'isolat protéique avant et après compression à 1700 g. Les hauteurs H_0 et H_f est utilisée pour estimer les volumes de gel V_0 avant et V_f après compression.

On observe (fig.3.13) qu'après centrifugation, le volume de gel a diminué et du solvant a été exudé. En supposant que la solution exudée ne contient pas de protéines, la concentration du gel compressé est de 300 ± 30 g/L d'isolat pour les trois gels initialement concentrés à 40, 70 et 100 g/L. Pour une solution d'isolat protéique de tournesol à 100 g/L, dans un solvant tampon phosphate à pH 7.6, après chauffage à 98°C puis refroidissement à 20°C, $G' = 500$ Pa [81].

L'évaluation des modules de cisaillements élastiques et visqueux, de l'isolat présenté ici, permettra d'étudier plus précisément les propriétés rhéologiques du gel ainsi formé.

3.2.4.2 Caractérisation rhéologique

Afin de maximiser la solubilité de l'isolat de tournesol pour la caractérisation des propriétés rhéologiques en fonction de la température, on utilise le solvant NaOH (pH 10, $I = 0.1$ mM) pour préparer des solutions de concentrations variables. Un rhéomètre en contrainte imposée est utilisé avec la géométrie plan-plan striée afin d'éviter le glissement. On charge l'échantillon à température ambiante sur le support puis l'entrefer est fixée à 1 mm de la surface. Afin d'éviter l'évaporation de la solution lors de la montée en température, la solution est entourée par un bain d'huile silicone allant jusqu'au contact de la géométrie. Pour éviter un effet de glissement due à la rétractation de l'échantillon, l'entrefer varie de manière à garder une force normale nulle (0.0 ± 0.4 N). Les mesures des modules élastiques G' et visqueux G'' sont effectuées avec une fréquence d'oscillation de 1 Hz et une amplitude de déformation de 0.01 %. La rampe de température imposée est la suivante : la solution est chauffée jusqu'à 90°C avec une rampe à 5°C/min puis un plateau de température est maintenu pendant une durée qui permet de produire un gel avec des modules G' et G'' stables. La température diminue ensuite de 2°C/min jusqu'à atteindre 20°C, puis les mesures continuent à cette température pendant 1 h.

Pour évaluer le temps nécessaire de chauffe à 90°C, les mesures des modules élastiques et visqueux sont effectuées avec une solution à 50 g/L. Le palier à 90°C est maintenu pendant 1 et 12h (fig. 3.14).
L'entrefer est constant pendant toute la durée de l'expérimentation. A partir de 600 s, à 57°C, $G' > G''$ donc le gel se forme. Au bout de 1 h à 90°C, $G' = 9 \pm 3$ Pa et $G'' = 0.6 \pm 0.2$ Pa et au bout de 12 h à 90°C, $G' = 10$ Pa et $G'' = 0.5$ Pa. On considère donc que les modules élastiques G' et visqueux G'' deviennent constants au bout de 1 h de temps de chauffe à 90°C. On utilise donc ce plateau de 1 h à 90°C pour la suite des mesures. Lors du refroidissement au bout de 1 h les modules augmentent puis deviennent stable à température ambiante, $G' = 47$ Pa et $G'' = 7$ Pa. Au bout de 12 h, les résultats avec la baisse de température ne sont pas disponibles à cause d'un problème informatique dû à la durée de l'expérience et il n'apparaissait pas utile de recommencer l'expérience.
Les modules élastiques G' et visqueux G'' des solutions à 50, 100 et 300 g/L ont été mesurés avec le même protocole que pour les résultats présentés à la figure 3.14 avec un palier de 1 h à 90°C.
La figure 3.15 montre la température et la hauteur de l'entrefer (a) ainsi que les modules élastiques G' et visqueux G'' (b) en fonction du temps, à différentes concentrations d'isolat protéique en solution. Le temps $t = 0$ s correspond au démarrage de l'augmentation e température, à partir de 20°C. Les temps de début de la gélification ($G' > G''$) sont respectivement $t = 300$ s à 42°C pour la solution à 300 g/L et pour les solutions à 100 g/L et 50 g/L $t = 700$ s à 75°C. Pour les solutions à 300 g/L et 100 g/L G' et G'' augmentent sans devenir stables à la fin du palier de 1 h à 90°C contrairement à la solution à 50 g/L. Après le refroidissement jusqu'à température ambiante, G' et G'' sont stables et ont pour valeurs $G' = 912$, 300 et 48 Pa et $G'' = 96$, 37 et 7 Pa pour les solutions à 300 g/L, 100 g/L et 50 g/L (fig. 3.15 (c)). Pendant et après le refroidissement, l'entrefer diminue et se stabilise à 88 % et 93 % de sa valeur initiale pour les concentrations à 300 g/L et 100 g/L. L'entrefer reste

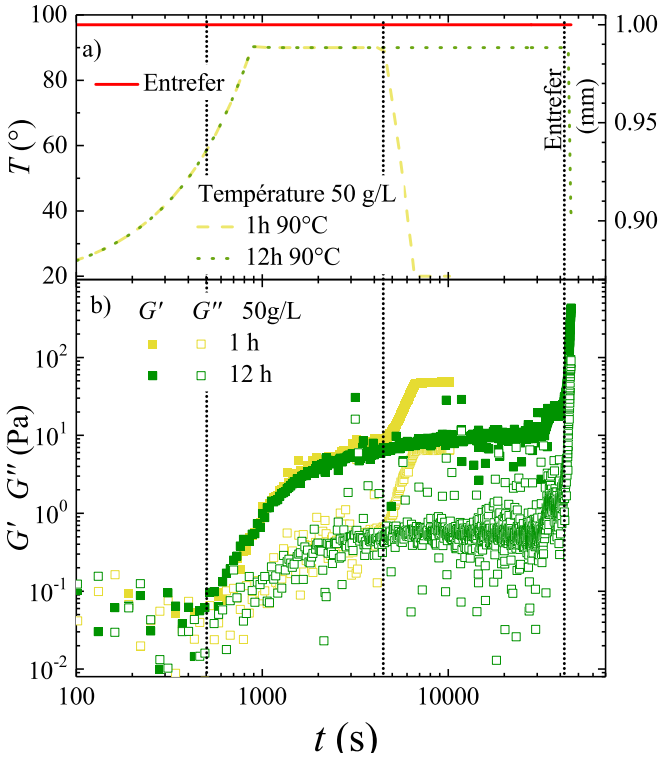


Fig. 3.14: a) Température (traits en pointillés) et entrefer à force normale constante (traits pleins) en fonction du temps.
b) Modules élastiques (symboles pleins) et visqueux (symboles vides) en fonction du temps ($\gamma = 0.01$ %, $f = 1$ Hz).

constant à 1 mm pour la solution à 50 g/L pour toute la durée de l'expérience. La rétractation du gel et l'augmentation du module élastique avec le refroidissement suggèrent le renforcement d'un gel physique par des interactions non covalentes comme les ponts hydrogènes et les interactions de van der Waals comme on peut le lire dans la littérature (gélification de protéines de tournesol [4] et de protéines du lait [184]).

Immédiatemant après les mesures de G' et G'' en fonction du temps, les modules élastiques et visqueux ont été mesurés, à déformation constante (γ=0.01 %) en faisant varier la fréquence des oscillations, de 0.01 Hz à 100 Hz (fig. 3.16 (a)). Puis G' et G'' ont été mesurés, à fréquence constante ($f = 1$ Hz), en faisant varier la déformation de 10^{-4} % à 10^{3} % (fig. 3.16 (b)). Les modules élastiques et visqueux augmentent légèrement avec la fréquence d'oscillation (fig. 3.16 (a)). Pour les concentrations $C = 50$ et 100 g/L, G' et G'' sont parallèles et suivent une loi de puissance f^p où $p = 0.10 \pm 0.03$ excepté pour le module visqueux de la solution 300 g/L. L'évolution de G' et G'' avec la fréquence montrent que le gel n'a pas de temps caractéristique de relaxation entre 100 et 10 s.
D'après les mesures de G' et G'' en fonction de la déformation (fig. 3.16 (b)), il existe un domaine linéaire où G' et G'' sont indépendant de la déformation imposée. Au delà d'une déformation critique γ_c, G' et G'' chutent brutalement et G' devient inférieur à G'' indiquant la cassure. On considère que γ_c correspond à une diminution de G' de 50 % de sa valeur dans le domaine linéaire, présenté à la figure 3.15 (c). $\gamma_c = 160$ % pour la solution à 300 g/L et 93 % pour les solutions à 100 g/L et 50 g/L.

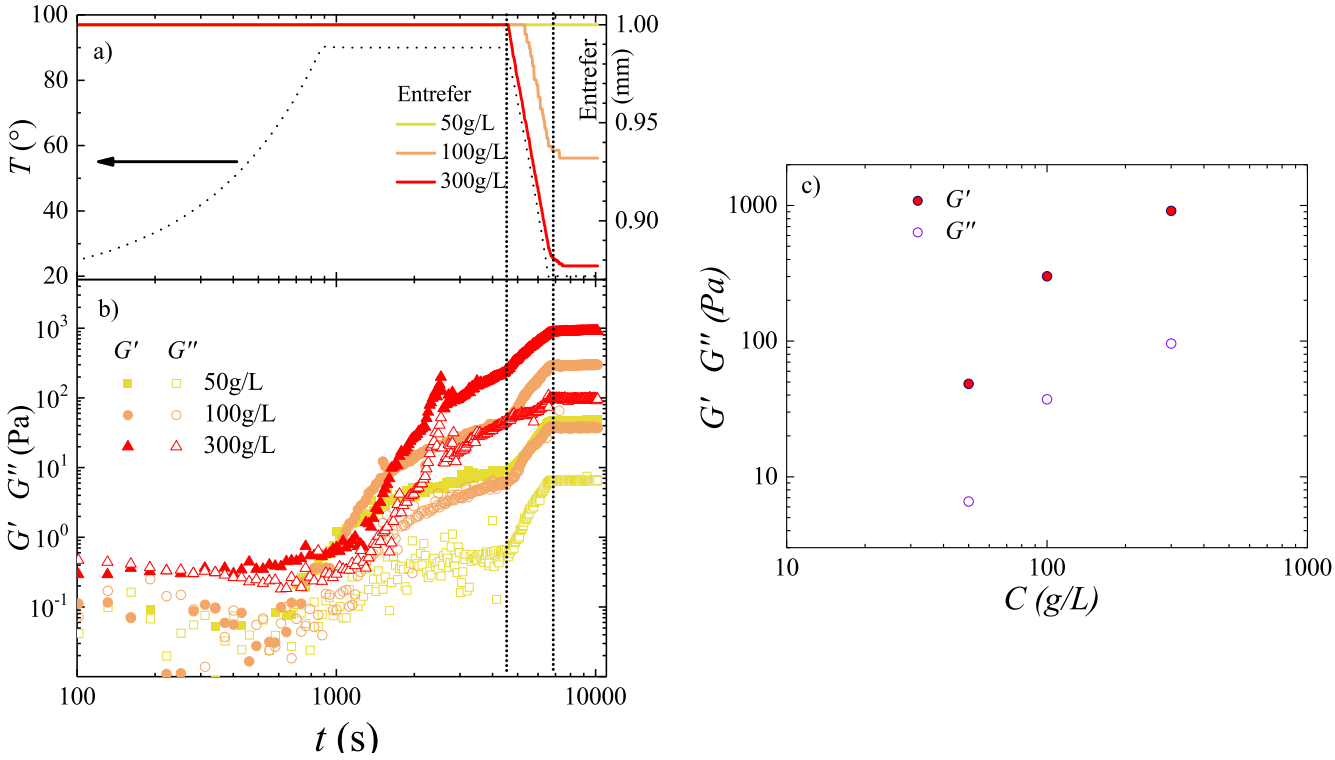


Fig. 3.15: a) Température (traits en pointillés) et distance de l'entrefer à force normale constante (traits pleins) en fonction du temps.
b) Modules élastiques (symboles pleins) et visqueux (symboles vides) en fonction du temps ($\gamma = 0.01$ %, $f = 1$ Hz).
c) Modules élastiques et visqueux après traitement thermique, en fonction de la concentration initiale d'isolat protéique en solution.

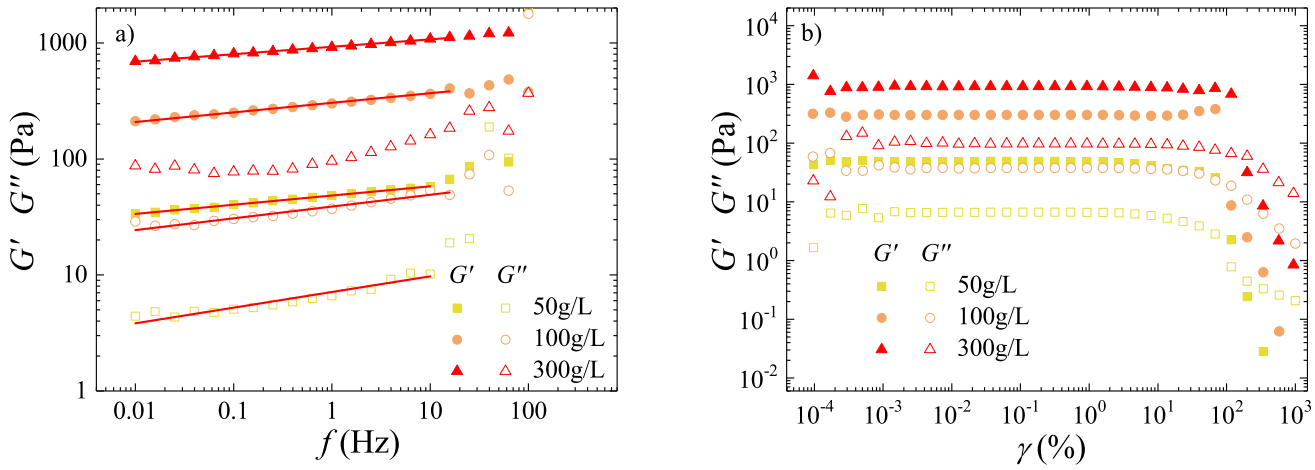


Fig. 3.16: Modules élastiques (symboles pleins) et visqueux (symboles vides) en fonction de la fréquence (a) et de la déformation (b). Les traits pleins correspondent aux ajustements en loi de puissance.

Le criblage des conditions physico-chimiques de gélification a montré une gélification possible de l'isolat de tournesol pour des pH de 5 à 10 avec des forces ioniques de 0.1 à 1 M. La gélification

est totale à partir de 40 g/L d'isolat initialement solubilisé dans un solvant BTP (pH 9, $I = 0.1$ M). Sous compression à 1700 g, la matrice gélifiée exude jusqu'à atteindre une concentration de 300 g/L alors qu'elle était dans une gamme de concentration de 40 à 100 g/L avant compression. Dans la littérature, pour une solution d'isolat protéique de tournesol préparé à 100 g/L dans un solvant tampon à pH 7.6 et $I = 0.2$ M, le module élastique du gel de protéines de tournesol refroidi à température ambiante est $G' = 500$ Pa [81], ce qui correspond à nos mesures où $G' = 300$ Pa. Dans les même conditions physico-chimiques, à la même concentration d'isolat de soja, $G' = 5000$ Pa [185]. Cela montre les faibles propriétés gélifiantes des protéines de tournesol devant celles de protéines utilisées commercialement.

3.3 Isolat de colza

Le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Mélody Basselin) nous a fournis deux lots d'isolat de colza. Le lot 1 contient 72 % d'albumines de colza. les 28 % restants sont de l'acide phytique (10 à 15 %), des composés phénoliques et des composés cellulosique. Le lot 2 est composé à 100 % en albumines. Le lot 1 a été utilisé pour le criblage des conditions physico-chimiques de gélification et l'étude des propriétés interfaciales alors que le lot 2 n'a été utilisé que pour les propriétés interfaciales à cause d'une quantité disponible très limitée ($\simeq 10$ g).

3.3.1 Solubilité

Pour évaluer l'acidité du lot 1 en solution, on mesure le pH d'un volume connu d'eau auquel on ajoute de petits volume d'une solution protéique de colza (lot 1) concentrée à 100 g/L. Le pH est mesuré après chaque ajout (fig. 3.17). Le pH de l'eau diminue avec la concentration en solution du lot 1 C jusqu'à atteindre un palier à 3.6 pour $C \geq 20$ g/L. La baisse de pH, liée à l'ajout d'isolat est probablement due à la présence d'acide phytique dans l'isolat (10 à 15 % w/w) dont le pKa le plus acide vaut 1.9.

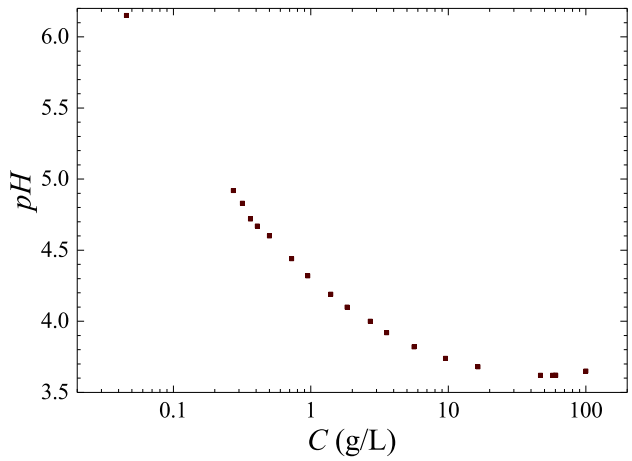


Fig. 3.17: pH d'une solution de colza à différentes concentrations dans l'eau milliQ.

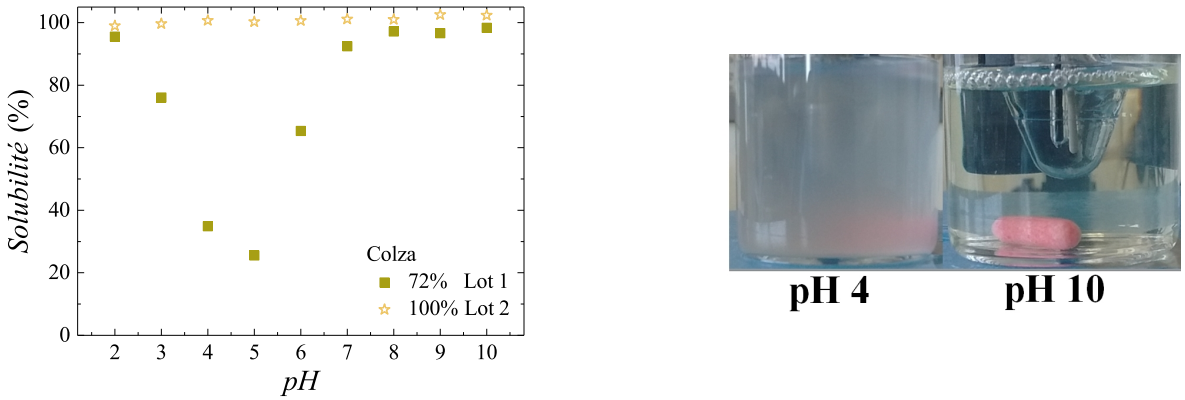


Fig. 3.18: a) Évolution de la solubilité des deux lots de colza en fonction du pH. les carrés pleins correspondent au lot 1 et les étoiles vides correspondent au lot 2.
b)Image de solutions de colza à 1 g/L dans l'eau (pH 4) et dans l'hydroxyde de sodium à 4.7 mM (pH 10).

La figure 3.18 (b) montre une solution à 1 g/L du lot 1 à pH 4 et pH 10. La solution est transparente à pH basique et turbide à pH acide. La turbidité de la solution à pH acide montre une formation d'agrégats. Ces agrégats sont probablement des assemblages protéiques. Leurs présence à pH acide suggèrent une solubilité de l'isolat protéique (lot 1) plus basse qu'à pH basique qui est confirmé par les résultats obtenus au LRGP par la méthode Kjeldhal (Mélody Basselin, Romain Kapel, fig. 3.18 (a)). Les mesures montrent pour le lot 1 un creux de solubilité à pH 5 et une solubilité maximale pour le pH inférieur à 2 et supérieur à 7. Le lot 2, coomposé à 100 % en albumines, est quant à lui soluble sur toute la gamme de pH (fig. 3.18 (a)). Les impuretés présent dans le lot 1 (acide phytique, composés phénoliques) ont donc un rôle majeur dans la solubilité de l'isolat.

3.3.2 Rayons hydrodynamiques

Les rayons hydrodynamiques caractéristiques des isolats de colza en solution sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS, section 2.1.3). Un solvant NaOH est utilisé pour préparer une solution à 10 g/L d'isolat protéique à pH 10 avec les lots 1 et 2. Le choix du solvant basique est effectué pour maximiser la solubilité de l'isolat du lot 1 qui montre un creux de solubilité à pH acide.

La figure 3.19 montre les fonctions d'autocorrélation à l'angle de détection de 90° pour des solutions à 10 g/L préparées avec les lots 1 (a) et 2 (b). Les données expérimentales sont ajustées par une exponentielle simple (traits et pointillés), par la méthode des cumulants (traits en pointillés) et par une double exponentielle (traits pleins). Pour le lot 1 (a), le meilleur ajustement est obtenu avec la double exponentielle qui indique la coexistence de deux populations en solutions. L'incertitude relative des taux de décroissance est de 3 % pour les populations lentes et 15% pour les populations rapides.
Pour le lot 2 (b),le meilleur ajustement est obtenu avec la méthode des cumulants qui indique la pré-

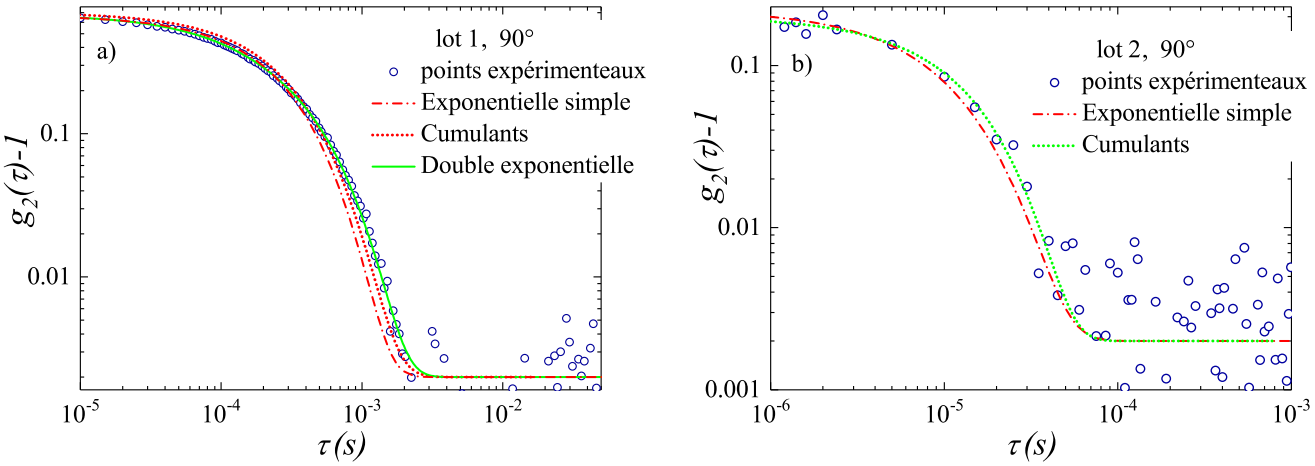


Fig. 3.19: Mesure de la fonction d'auto-corrélation en fonction du retard à l'angle de détection de 90°. Les points expérimentaux sont ajustés par une exponentielle simple (traits et pointillés), par la méthode des cumulants (traits en pointillés) et par une double exponentielle (traits pleins) avec le lot 1 (a) et avec le lot 2 (b).

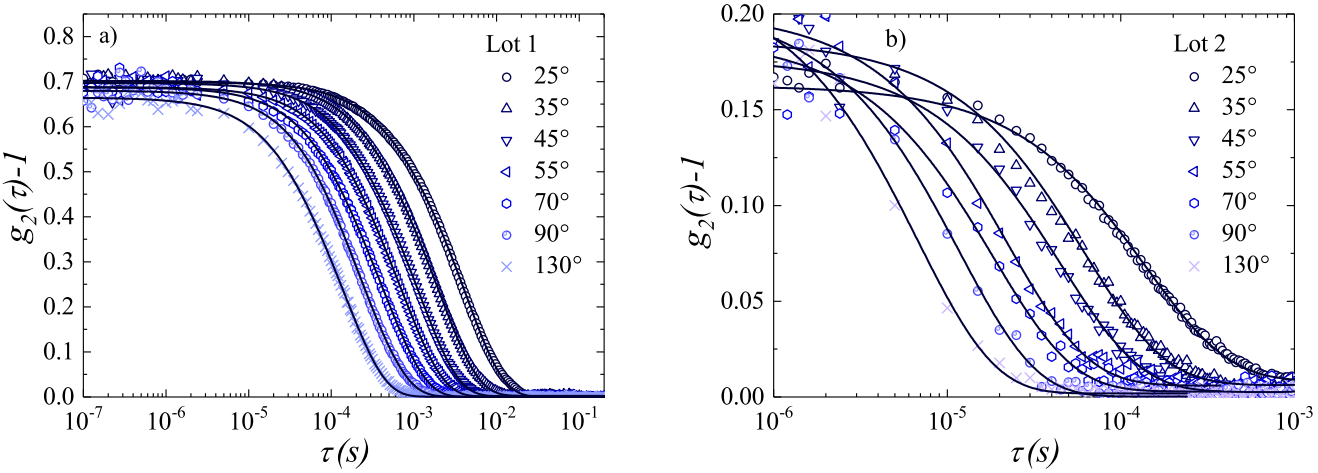


Fig. 3.20: Mesure de la fonction d'auto-corrélation en fonction du retard à différents angles. Les points expérimentaux sont ajustés par la méthode des cumulants (traits en pointillés) pour le lot 1 (a) et par une double exponentielle (traits pleins) avec le lot 2 (b).

sence d'un population avec une polydispersité. L'incertitude relative des temps caractéristiques de décroissance, ajustés par les cumulants, est de 7%. La figure 3.20 montre les fonctions d'autocorrélation à différents angles de détection avec les lots 1 (a) et 2 (b).

Les taux de décroissance obtenus pour le lot 2 (fig. 3.21 (b)) sont ajustés par une loi de puissance d'exposant 2, caractéristique d'une dynamique brownienne. Le préfacteur de la loi de puissance correspond au coefficient de diffusion de la population présente (eq. 2.11) dans le lot 2. On trouve $D = 84 \pm 20$ μm^2/s avec un indice de polydispersité moyenné sur tous les angles qui est de 0.1. Cela correspond à une population faiblement polydisperse. Le coefficient de diffusion permet d'évaluer un rayon hydrodynamique pour les albumines de colza par la relation de Stokes-Einstein (eq. 2.12).

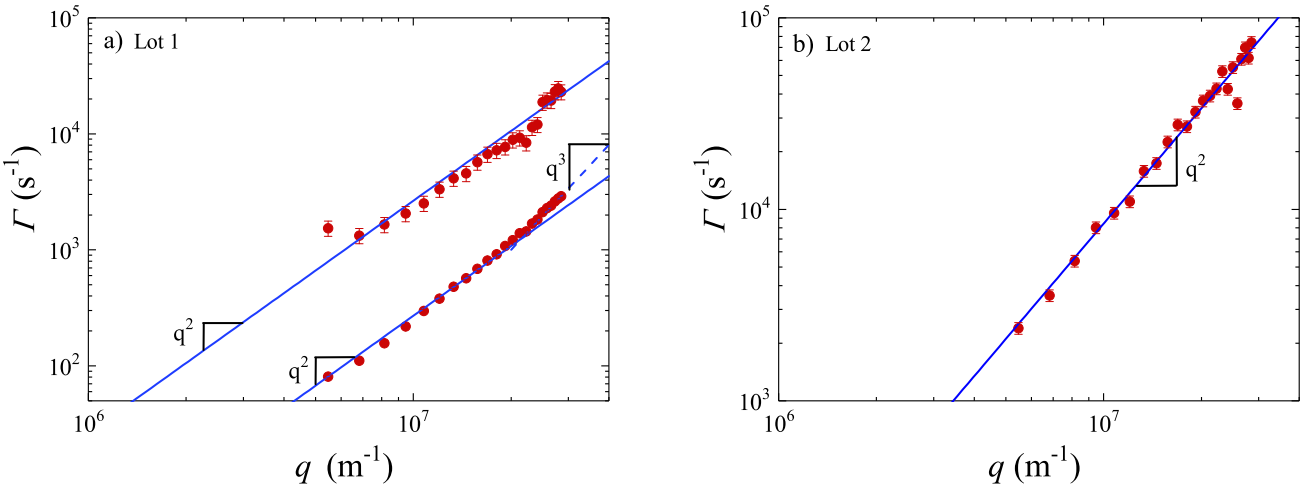


Fig. 3.21: Taux de décroissance en fonction du vecteur de diffusion q pour les lot 1 (a) et 2 (b). Les traits pleins correspondent aux meilleurs ajustements en loi de puissance d'exposant 2 et 3.

On obtient $R_H = 2.6 \pm 0.5$ nm ce qui est en accord avec la litterature ($D = 115$ μm^2/s, $R_H = 2.0$ nm, tampon phosphate pH 7, $I = 148$ mM [109]).
Pour le lot 1, $D_{rapide} = 26 \pm 6$ μm^2/s et $D_{lent} = 2.7 \pm 0.3$ μm^2/s. Les rayons hydrodynamiques associés sont $R_{H,rapide} = 8 \pm 3$ nm et $R_{H,lent} = 80 \pm 10$ nm. Le rayon hydrodynamique de la population rapide est sensiblement plus grand que ce qui a été mesuré avec le lot 2 et assimilé aux albumines. Le rayon hydrodynamique de la population lente est un ordre de grandeur supérieur au rayon hydrodynamique des albumines et n'est identifié que pour le lot 1. Cela indique que la population lente apparaît en présence d'acide phytique, de composés phénoliques et cellulosique. L'acide phytique interagit fortement avec les régions chargées positivement [186] car ses différents sites ionisables lui permettent de ponter les protéines et favoriser ainsi les assemblage protéines/protéines.
Pour la population lente, l'ajustement en loi de puissance d'exposant 2 est valable jusqu'à une valeur limite $q_l = 2{,}0 \times 10^7$ m^{-1}. On remarque que $\dfrac{1}{q_l} = 48$ nm, ce qui est dans l'ordre de grandeur du rayon hydrodynamique des populations lentes. Comme pour les assemblages trouvés avec l'isolat de tournesol, les fluctuations d'intensité dues aux mouvements internes à l'objet s'ajoutent aux fluctuations dues à la diffusion translationelle de l'objet. Pour un polymère en bon solvant, le taux de décroissance s'ajuste en loi de puissance d'exposant 3 [183] comme on peut l'observer (fig. 3.7).

3.3.3 Température de dénaturation

Pour évaluer les températures de dénaturation des lots avec et sans acide phytique, on effectue des mesures de microcalorimétrie sur l'isolat contenant 10 à 15 % d'acide phytique (lot 1) et l'isolat exempt d'acide phytique (lot 2). La figure 3.22 montre la différence de flux de chaleur ΔQ en fonction de la température pour le lot 1 (traits pleins) et le lot 2 (traits hachurés). La variabilité des mesures de ΔQ est due à la différence de masse entre la référence et l'échantillon. Pour le calcul des aires, l'incertitude relative est estimée à 10 % d'après le placement de la ligne de base. Les mesures

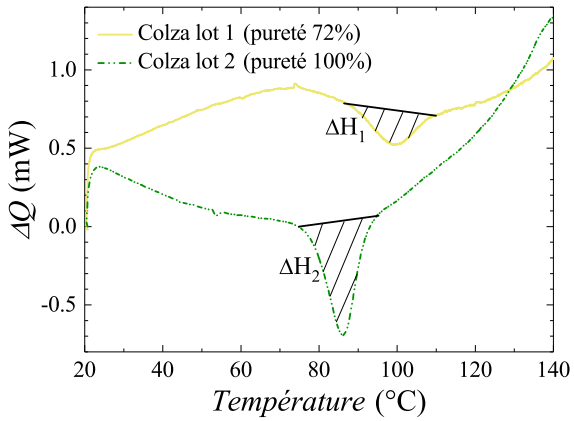


Fig. 3.22: Différence de flux de chaleur ΔQ en fonction de la température. Les solutions sont préparées à 100 g/L avec le lot 1 (traits pleins) et le lot 2 (traits hachurés) dans un solvant hydroxyde de sodium.

obtenues avec le lot 2 montrent un pic endothermique dont le minimum est à 86°C. L'intégration du flux de chaleur par le temps donne $\Delta H_2 = 8.7$ J/g de protéines. Pour le lot 1, le pic endothermique a son minimum à 99.3°C et l'enthalpie de réaction vaut $\Delta H_1 = 5.0$ J/g de protéines. La température de dénaturation des albumines purs (lot 2) est plus basse que celle des albumines avec acide phytique, composés phénoliques et cellulosiques (lot 1). Cela suggère que l'acide phytique et/ou les composés phénoliques stabilise la structure de l'état natif des albumines et modifie le changement de configuration. L'enthalpie de dénaturation est plus élevée pour le lot pur en albumines. Cela montre que l'isolat pur contient une plus grande quantité d'albumines non dénaturées.

Dans la littérature, la dénaturation des albumines est associée à un pic endothermique observé généralement entre 106°C et 120°C [121]. Dans une solution tampon phosphate (pH 7.4, $I = 0.01$ M), la température de dénaturation des albumines est de 110°C et avec une enthalpie de dénaturation $\Delta H = 15.9$ J/g [187]. Les valeurs des températures de dénaturation et d'enthalpies de dénaturation trouvées dans la littérature sont plus hautes que les valeurs présentées ici. On a vu que la présence d'impuretés peut faire varier la température de dénaturation, on peut donc supposer que les différences mesurés entre l'expérimentation présentée dans ce manuscrit et la littérature sont liés aux impuretés et plus largement à la méthode de purification qui agit fortement sur l'état de la protéine purifiée. Lorsque la température de dénaturation est différente les processus de dénaturation sont différents, il n'y a donc aucune raison pour que l'enthalpie de dénaturation soit la même.

3.3.4 Criblage des conditions physico-chimiques de gélification

Le criblage des conditions physico-chimiques de gélification de l'isolat de colza (lot 1) a été effectué de le même manière que pour l'isolat de tournesol. On utilise les solvants tampon citrate (pH 3), acétate (pH 5), phosphate (pH 7) et bistrispropane (pH 9) pour préparer des échantillons à 100 g/L. Les solvants tampons ont une force ionique de $I = 0.1$ M. On ajoute du NaCl au solvants tam-

pons pour obtenir les forces ioniques $I = 0.2, 0.5$ et 1 M. La figure fig.3.23 montre les échantillons

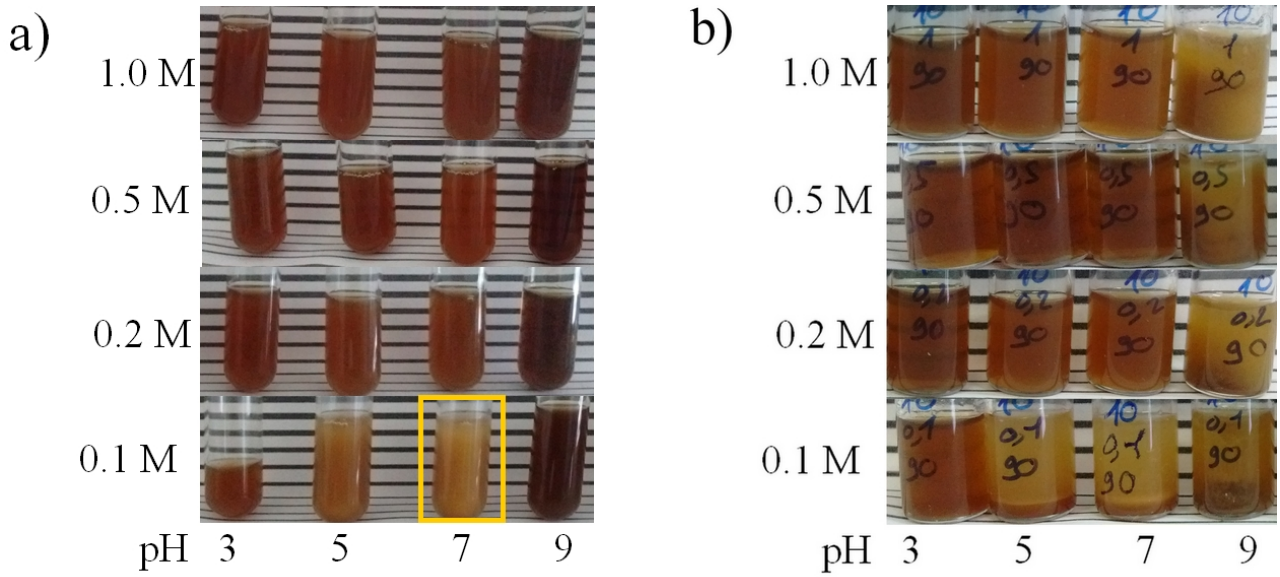


Fig. 3.23: Images des échantillons à 100 g/L dans des solutions tampon aux pH et forces ioniques indiquées sur la figure, avant (a) et après (b) chauffage à 90°C. Le cadre à pH 7 et $I = 0.1$ M indique l'échantillon avec laquelle a été effectué le cliché microscopique de la figure suivante.

avant (a) et après (b) chauffage. Les solutions à pH 9 sont les plus noirs et les plus transparentes, sans variation visible avec la force ionique. Cela suggère une meilleure absorption de lumière des polyphénols à pH 9 qui absorbe les longueurs d'onde du spectre visible avec un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm selon l'environnement [172, 177]. Les solutions à pH 5 et 7 apparaissent orangés laiteux à cause de la turbidité, à force ionique de 0.1 M. Pour des forces ioniques supérieurs à 0.1 M les solutions à pH 5 et 7 sont marrons orangés avec une turbidité plus faible. Cela suggère une solubilité plus basse à faible force ionique. Les solutions à pH 3 sont légèrement plus marrons avec une faible turbidité, sans effet de la force ionique.

Après chauffage à 90°C pendant 1 h, les solutions à pH 9 sont devenues plus claires, jaunâtre, avec un précipité très visible pour une force ionique de 0.1 M et moins visible pour des forces ioniques plus élevées. Ce précipité est également visible pour les solutions à pH 5 et 7 à la force ionique 0.1 M. La coloration des autres solutions ne semble pas modifiée avec le traitement thermique. Lorsque l'on "sonde" la solution avec une aiguille on observe pour les solutions à pH 9 au milieu de l'échantillon, une zone gélifiée. Cette zone gélifiée est la plus volumineuse pour la force ionique $I = 0.5$ M.

Le criblage des conditions physico-chimiques pour la gélification des albumines de colza avec un traitement thermique à 90°C n'a pas produit de gélification homogène de l'échantillon. Cela est attribué à la température de dénaturation des albumines à 99°C, supérieure à la température de chauffe où le criblage a été effectué.

Le cliché microscopique de la solution à 100 g/L (pH 7 et $I = 0.1$ M) montre des gouttes dans le liquide. Cela met en évidence la séparation de phases liquide/liquide 3.24. Lors d'autres expérimentations, cette séparation de phases a également été observée à pH 3 et $I = 0.1$ M.

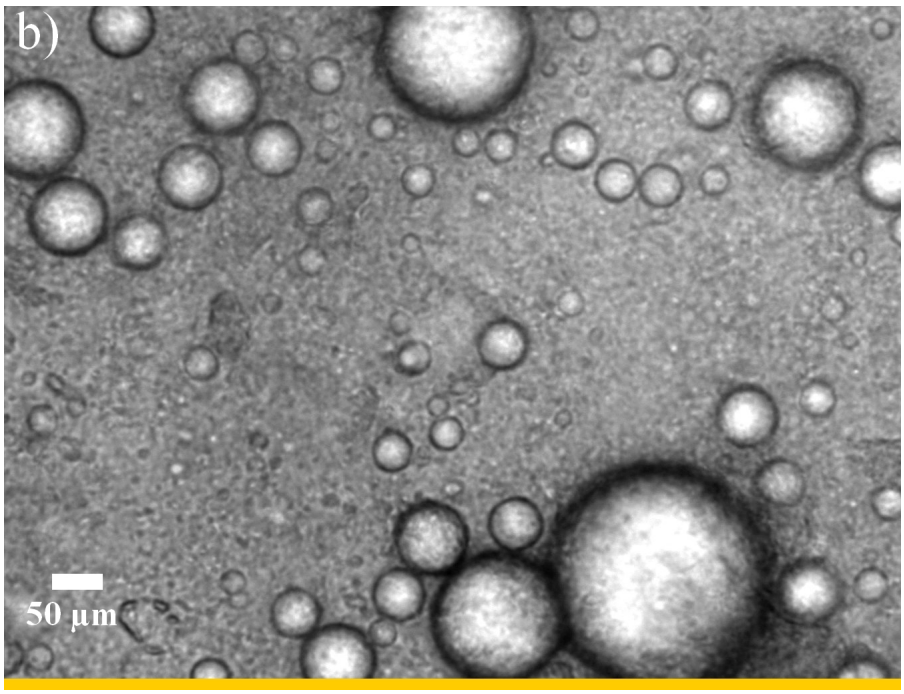


Fig. 3.24: Cliché de microscopie optique d'un échantillon de colza (lot 1) à la concentration de 100 g/L à pH 7 et de force ionique $I = 0.1$ M).

3.3.5 Séparation de phases liquide/liquide

Les échantillons centrifugés montrent trois phases comme illustré dans l'image d'une solution à 300 g/L (pH 7, $I = 0.1$ M) centrifugée à 1700× g pendant 30 min (fig. 3.25). On observe une phase légère transparente, colorée en jaune. La phase dense est également transparente et colorée en noir. Ces deux phases sont séparées par une phase intermédiaire, opaque, de couleur blanchâtre. Pour évaluer l'effet de la concentration initiale d'isolat protéique sur le volume des phases denses et légères, on définit la fraction de phase dense ϕ_d comme le rapport du volume de phase dense sur le volume total de la solution. Des solutions de concentrations en isolat protéique de 200, 300, 400 et 500 g/L ont été préparées à pH 3, 5 et 7 ($I = 0.1$ M) puis centrifugées à 1700g pendant 30 min.
La figure 3.26 montre les images des solutions avant (a) et après (b) centrifugation. L'évaluation de la fraction volumique de la phase dense ϕ_d est effectuée par l'analyse des images.

La figure 3.27 montre la fraction de phase dense en fonction de la concentration initiale en isolat

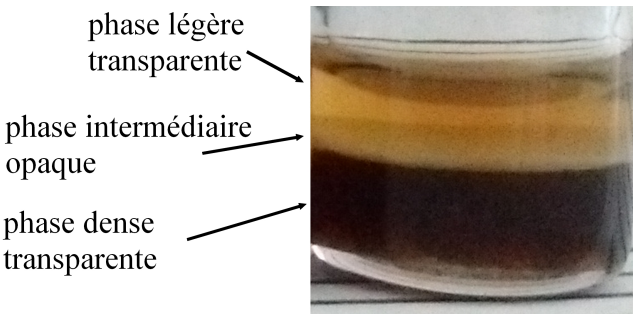


Fig. 3.25: Observation de la séparation de phase après centrifugation. (300 g/L, pH 7 $I = 0.1$ M)

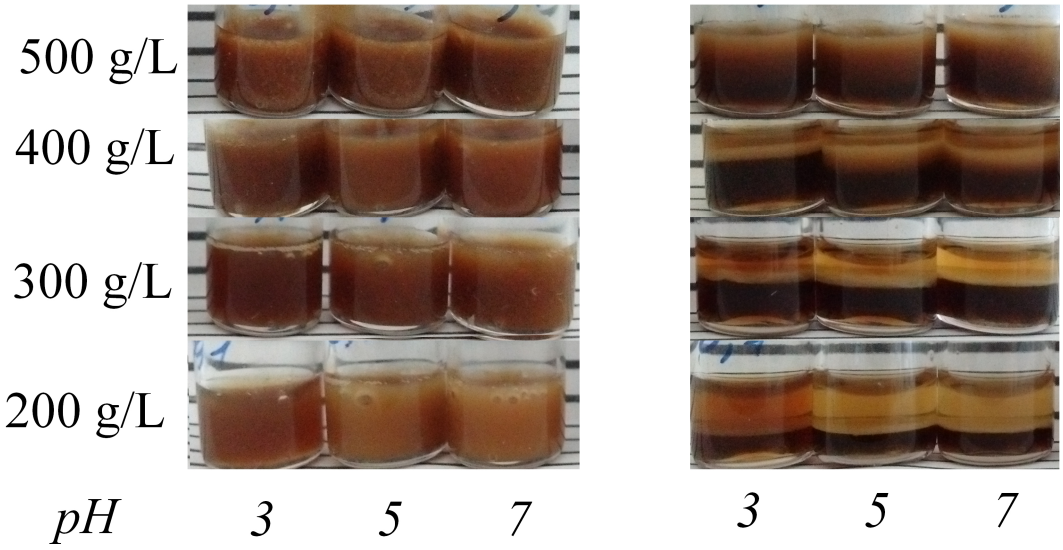


Fig. 3.26: Images des solutions d'isolat protéique à concentration en isolat protéique variables dans les solutions tampons citrate (pH 3), acétate (pH 5) et phosphate (pH 7), avant (a) et après (b) centrifugation à 1700g pendant 30 min à la force ionique $I = 0.1$ M.

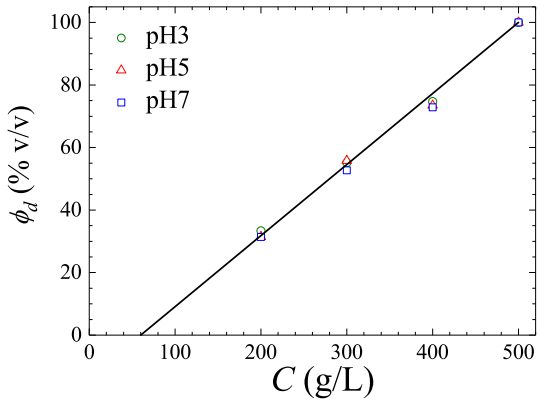


Fig. 3.27: Fraction volumique de la phase dense en fonction de la concentration initiale en isolat protéique à différents pH. L'ajutement linéaire (traits plein) coupe l'abscisse à 60 g/L.

protéique dans la solution. ϕ_d augmente linéairement avec la concentration jusqu'à 500 g/L où aucune séparation de phase n'est observable. Le pH ne semble pas influer sur la fraction de phase dense. L'ajustement linéaire des mesures coupe l'axe des abscisses à 60 g/L. Par ailleurs, les phases denses et légères ont été chauffées individuellement à 90°C mais aucun changement visible n'a été observé en dehors d'une viscosité plus basse à haute température.

On a fait l'hypothèse que cette phase blanchâtre pouvait contenir les impuretés cellulosiques et donc que cette séparation de phase pourrait être utilisée pour une purification plus poussée de l'isolat de colza. Afin d'évaluer la pureté de la phase dense en protéines, un dosage des sucres à été effectué (Gwenaëlle Deschamps, IUT Chimie, Sète). Ce dosage a été complété par une analyse de la composition en protéines des deux phases par chromatographie en phase liquide à haute pression (Melody Basselin, LRGP). Les globulines de colza sont majoritairement dans la phase légère mais

le rapport de la concentration en sucre sur la concentration en protéine est identique dans les deux phases. Cela indique que la phase dense n'est pas plus pure concernant les composés cellulosiques. Cette séparation de phase n'apparaît donc pas comme une méthode supplémentaire de purification de l'isolat de colza.

3.4 Conclusion

La solubilité des isolats de tournesol est maximale à pH basique (pH 10) avec un creux de solubilité à pH plus acide (pH 5) comme l'isolat de colza contenant de l'acide phytique et des composés phénoliques. La séparation de phase liquide/liquide, mise en évidence pour l'isolat de colza, n'a pas permis pas d'améliorer la purification de celui ci. En revanche, l'isolat de colza pur, composé exclusivement d'albumines, montre une excellente solubilité sur toute la gamme de pH, comme les albumines de tournesol.

A l'exception de l'isolat de colza pur, les solutions d'isolats de protéines végétales étudiées ne contiennent pas uniquement des protéines sous forme monomériques. La présence d'assemblages avec des tailles de l'ordre de 80 nm est mise en évidence pour les trois sources protéiques. Dans le cas du blé, des assemblages protéines/protéines sont envisagés alors que pour le colza et le tournesol la présence d'impuretés telles que l'acide phytique et/ou les composés phénoliques semblent être à l'origine des assemblages. Cependant, dans tous les cas la population de protéines monomériques apparaît majoritaire.

Les températures de dissociation trouvées avec l'isolat de tournesol correspondent aux températures de dissociation des formes hexamériques et trimériques en monomères. Les solutions de tournesol à pH basique, utilisées pour l'étude interfaciale, contiennent des hexamères de globulines à l'état natif mais pas de trimères non dénaturés. Pour l'isolat de colza, la température de dénaturation des albumines a été trouvée plus faible en absence d'acide phytique ce qui suggère que l'acide phytique lié aux albumines participe au maintien de leur structure native et modifie les processus de dénaturation induits par la température.

Le criblage des conditions physico-chimiques de gélification pour l'isolat de colza montre qu'une température de 90°C n'est pas suffisante pour gélifier les solutions d'albumines de colza. A pH 9, on trouve au mieux une gélification partielle.
En revanche, le criblage des conditions physico-chimiques de gélification de l'isolat de tournesol à mis en évidence une gélification totale de l'échantillon pour des pH entre 5 et 10, aux forces ioniques de 0.1 M à 1 M. Le gel semble qualitativement le plus cohésif à pH 9 et $I = 0.1$ M. L'étude rhéologique de solutions de tournesol à pH 10 a montré que le gel formé est un gel physique avec des interactions sensibles à la température donc non covalentes. L'élasticité des gels formés par dénaturation thermique de l'isolat d etournesol est un ordre de grandeur plus bas que pour un gel formé par

des protéines utilisées dans le commerce comme les protéines de soja. L'existence de gel de tournesol est peu rapporté dans la littérature. Et en dépit de propriétés gélifiantes plus faibles que d'autres protéines, on peut imaginer trouver des applications aux gels de tournesol. Par exemple, une étude non publiée des propriétés émulsifiantes du même isolat de tournesol montre une stabilité remarquable (W. Dridi, F. Leal Calderon, Bordeaux). La combinaison des propriétés émulsifiantes avec les propriétés gélifiantes de cet isolat en fait un composant texturant potentiellement valorisable pour sa double aptitude, émulsifiante et gélifiante.

4. GLIADINES À L'INTERFACE AIR/EAU

4.1 Publication

Le projet d'étude des protéines de tournesol et de colza a nécessité le développement de procédés de purification des tourteaux par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres, Mélody Basselin). Les isolats ont été disponibles plusieurs mois après le début du projet, ce qui nous a conduit à étudier les propriétés interfaciales d'un isolat protéique de blé déjà disponible au laboratoire Charles Coulomb. Ce travail a pu être valorisé par un article et est présenté ici avec l'ajout de données complémentaires en fin de chapitre.

Journal of Colloid and Interface Science 526 (2018) 337–346

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

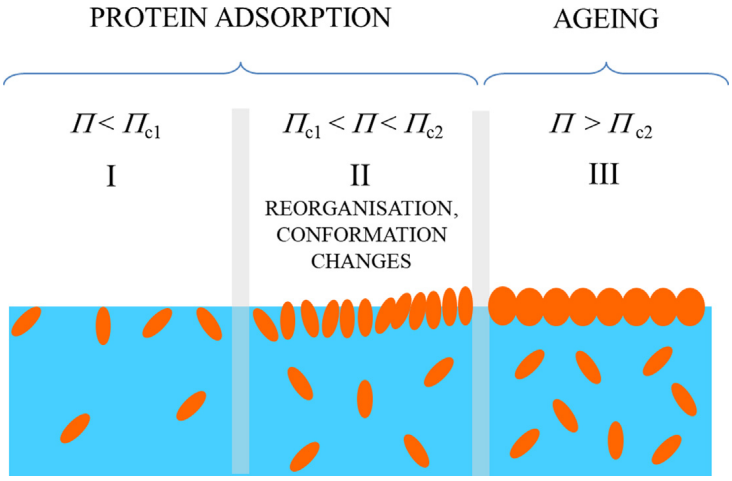
Regular Article

Multistep building of a soft plant protein film at the air-water interface

Alexandre Poirier, Amélie Banc *, Antonio Stocco *, Martin In, Laurence Ramos

Laboratoire Charles Coulomb (L2C), University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 December 2017
Revised 22 April 2018
Accepted 23 April 2018
Available online 26 April 2018

Keywords:
Gliadin
Soft plant protein
Air-water interface
Tensiometry
Dilatational rheology
Ellipsometry
Master curve
Conformational change

ABSTRACT

Gliadins are edible wheat storage proteins well known for their surface active properties. In this paper, we present experimental results on the interfacial properties of acidic solutions of gliadin studied over 5 decades of concentrations, from 0.001 to 110 g/L. Dynamic pendant drop tensiometry reveals that the surface pressure Π of gliadin solutions builds up in a multistep process. The series of curves of the time evolution of Π collected at different bulk protein concentrations C can be merged onto a single master curve when Π is plotted as a function of αt where t is the time elapsed since the formation of the air/water interface and α is a shift parameter that varies with C as a power law with an exponent 2. The existence of such time-concentration superposition, which we evidence for the first time, indicates that the same mechanisms govern the surface tension evolution at all concentrations and are accelerated by an increase of the bulk concentration. The scaling of α with C is consistent with a kinetic of adsorption controlled by the diffusion of the proteins in the bulk. Moreover, we show that the proteins adsorption at the air/water interface is kinetically irreversible. Correlated evolutions of the optical and elastic properties of the interfaces, as probed by ellipsometry and surface dilatational rheology respectively, provide a consistent physical picture of the building up of the protein interfacial layer. A progressive coverage of the interface by the proteins occurs at low Π. This stage is followed, at higher Π, by conformational rearrangements of the protein film, which are identified by a strong increase of the dissipative viscoelastic properties of the film concomitantly with a peculiar evolution of its optical profile that we have rationalized. In the last stage, at even higher surface pressure, the adsorption is arrested; the optical profile is not

* Corresponding authors.
E-mail addresses: Alexandre.poirier@umontpellier.fr (A. Poirier), Amelie.banc@umontpellier.fr (A. Banc), Antonio.stocco@umontpellier.fr (A. Stocco), Martin.in@umontpellier.fr (M. In), Laurence.ramos@umontpellier.fr (L. Ramos).

https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.087
0021-9797/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

modified while the elasticity of the interfacial layer dramatically increases with the surface pressure, presumably due to the film ageing.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Interfacial properties govern many structural and mechanical properties of bulk materials and dispersions. Common examples include the importance of grain-boundaries in the mechanical properties of atomic, molecular and colloidal polycrystals, and of surface actives species in stabilizing foams and emulsions, thanks to their adsorption at air/liquid or liquid/liquid interfaces [1]. Characterizing in details those liquid interfaces is the key to understand and possibly tune the bulk properties of foams and emulsions, which are crucial in a wide range of industrial applications from cosmetics to agrochemistry and pharmacy. There is a wealth of surface active species (e.g. soaps, phospholipids and polymer molecules with different architectures) that spontaneously adsorb at a liquid interface. Proteins, which are amphiphilic compounds made of polar and non-polar amino acid residues, also tend to accumulate at air/water and oil/water interfaces. Understanding and controlling the interfacial adsorption of proteins is important in many industrial fields from food science, to purification and implantable medical devices, for instance. Proteins films are usually characterized by a high viscoelasticity and can undergo a glass or gel transition due to a protein crowding at the interface even for low bulk concentrations of the subphase [2]. Up to now, the majority of detailed studies on interfacial properties of protein films has been conducted with animal proteins. Many works focused on bovine serum albumin, β-lactoglobulin and ovalbumin, which are globular proteins considered as hard proteins, and on β-casein, which is considered as a soft protein prone to conformational changes at the interface and yielding softer interfaces than hard proteins [3].

Interfacial properties of plant proteins have been much less investigated than their animal counterpart [4]. Among vegetable proteins, wheat storage proteins, commonly known as gluten proteins, represent an important part of the occidental people diet. Indeed, many food products traditionally contain wheat flour. In addition, gluten is also used as a texturing agent by the food industry that exploits the unique properties of the viscoelastic network created by these proteins. The interfacial properties of these proteins were also explored to better understand their role in the gas holding capacity of dough, and to determine their potentiality for the development of new products [5]. These studies were performed on either whole gluten proteins [6] or separately on the two main classes of gluten proteins: glutenins, the polymeric proteins, and gliadins, the monomeric ones. Gluten proteins are non-globular proteins that behave as polymers and display a persistence length similar to that of disordered proteins [7]. Their secondary structure is labile and depends of the environment [8] and osmotic pressure [9]. It was established that gliadins are more surface active than glutenins [10] and display at equilibrium lower surface tension at the air-water interface than soy glycinin, casein [11] or bovine serum albumin proteins [12]. Furthermore, gliadins were demonstrated to be very surface active for oil-water interfaces and form highly viscoelastic films [4a]. As a consequence, gliadins were studied to stabilize foams [10a,13] and emulsions [12]. However, the precise mechanism of gliadin adsorption at interface, the structure of the film formed and its rheology are still not well described.

In the present work, we investigate the adsorption of gliadins at the air-water interface from acidic solutions displaying a large range of concentration of proteins, from 1 mg/L to 110 g/L. Solutions are prepared at acidic pH, for which gliadins are the most soluble in aqueous solvent due to their neutral isoelectric point. A combination of tensiometry, dilatational viscoelasticity and ellipsometry measurements is performed as a function of time. A time-concentration superposition is evidenced whatever the subphase concentration and reveals that protein adsorption at the interface is dominated by bulk diffusion. We propose a consistent physical picture of the multistep diffusion-controlled irreversible adsorption of the gliadin proteins at an air/water interface, and discuss our main conclusive results in light of the literature. Overall all our experimental results indicate that gliadin displays a behavior typical of soft proteins.

2. Material and methods

2.1. Material

2.1.1. Gliadin extraction and characterization

Gliadins are extracted from industrial gluten (courtesy of Tereos Syral, France) according to a protocol previously described by some of us [7]. Briefly, gluten powder is mixed with 50% (v/v) ethanol/water solvent and submitted to a continuous rotating agitation for 19 h. After centrifugation, the supernatant is recovered and placed at 4 °C to induce a liquid-liquid phase separation. The light phase, enriched in gliadins, is recovered and freeze-dried. This fraction (labelled S2 in Ref. [7]) is characterized by Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-Page) and size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC). Fig. 1a displays the SE-HPLC profile measured on a TSK G400 SWXL column using the experimental conditions described in Dahesh et al. [14]. The molecular weight (M_w) composition deduced from the profile is 78% gliadins (25 000 < M_w < 55 000 g/mol), 15% glutenins (60 000 < M_w < 400 000 g/mol) and 7% albumins-globulins ($M_w \approx$ 20 000 g/mol).

2.1.2. Sample preparation

We use a 50 mM acetic acid aqueous solvent (purity 99%) (pH = 3) to fully solubilize gliadin proteins (gliadins are insoluble at neutral pH). Protein/solvent mixtures of concentration C = 50 g/L and higher are put in a rotary shaker overnight at room temperature to allow sample homogenization. They are subsequently filtered with a 0.22 μm cellulose mixed ester membrane. Diluted solutions are prepared from the stock solution at C = 50 g/L by dilution with 50 mM acetic acid aqueous solvent to reach the target concentrations.

2.1.3. Bulk sample characterizations

2.1.3.1. Size of the proteins. The hydrodynamic radius of the proteins in a acetic acid solution (50 mM) is characterized by dynamic light scattering (DLS) performed at a wavelength λ = 532 nm for 6 different scattering angles ranging between 40 and 120°. The number size distribution is dominated by objects with a hydrodynamic radius of 5 nm. This size is consistent with the radius of gyration of gliadins (3 < R_g < 5nm) measured by Thomson et al. [15] who modeled gliadins as prolate ellipsoids with an aspect ratio comprised between 4 and 6. We expect that the interfacial properties, as measured in this study, are majorly due to individual gliadins.

2.1.3.2. Dielectric constant and refractive index. The refractive index of the protein solutions in the visible range, n_{bulk}, is measured with

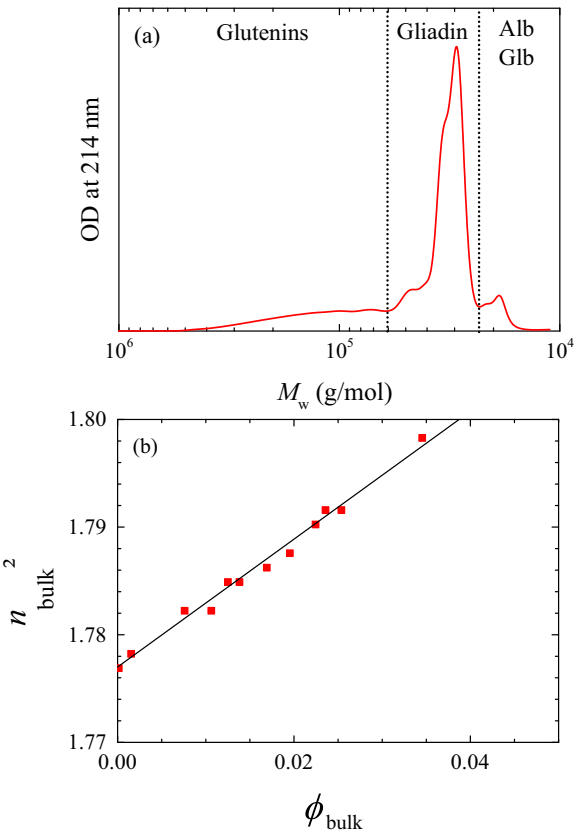


Fig. 1. Characterization of the protein extract. (a) Size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) profile of the gliadin extract. The dashed lines delineate the molecular weight (M_w) limits for albumin (alb) and globulin (glob) (M_w < 23000 g/mol), for gliadin (23,000 g/mol < M_w < 60,000 g/mol) and for glutenin (M_w > 60,000 g/mol). (b) Variation of the square of the refractive index of gliadin solutions as a function of the protein volume fraction. The line is a linear fit of the experimental data points.

an Abbe refractometer, for protein concentrations C from 0 to 50 g/L. Concentrations are converted in volume fraction of dry protein, φ_B, assuming a protein relative density $\rho = 1.32$ [16]. For φ_B in the range (0–0.038), the data can be very well accounted for by a linear variation of $n^2_{bulk}$with the volume fraction of proteins φ_B (Fig. 1b) as predicted theoretically. In the Wiener effective medium approximation [17], the dielectric constant $\varepsilon = n^2$ (with n the refractive index) is indeed expected to change linearly with φ_B. Hence the refractive index of the protein solutions, n_{bulk}, reads

$$n^2_{bulk}(\phi_B) = n^2_{solv}(1-\phi_B) + n^2_{prot}\phi_B \quad (1)$$

with $n_{solv} = 1.333$ the index of refraction of the solvent, and n_{prot} the index of refraction of the proteins. Eq. (1) can be rewritten as

$$n^2_{bulk}(\phi_B) = n^2_{solv} + \phi_B\left(n^2_{prot} - n^2_{solv}\right) = n^2_{solv} + \frac{\Delta(n^2)}{\Delta\phi}\phi_B \quad (2)$$

The best fit of the experimental data with Eq. (2) yields $\frac{\Delta(n^2)}{\Delta\phi} = 0.599$, giving an index of refraction of the proteins, $n_{prot} = \sqrt{n^2_{solv} + \frac{\Delta n^2}{\Delta\phi}} = 1.541$. This value is consistent with the literature ($n = 1.555$ was found for gliadins in 0.1 M acetic acid solution) [18].

2.2. Pendant drop tensiometry and dilatational rheology

2.2.1. Pendant drop tensiometry

A drop profile analysis tensiometer (PAT-1, SINTERFACE Technologies, Germany) is used for surface tension and surface dilatational rheology measurements. An aqueous drop (typical volume 15 mm^3) is formed at the capillary tip inside an empty measuring glass cell. The images of the drop are recorded and the interfacial tension is computed from the drop shape [19]. The surface pressure is defined as $\Pi = \gamma_{solv} - \gamma$, where γ_{solv} is the surface tension of the acetic acid aqueous solvent in absence of protein and γ is the surface tension of the protein solution against air.

2.2.2. Droplet washing

To assess the reversible character of adsorption, we use the drop profile tensiometer with a coaxial capillary to form a drop and subsequently wash the inside of the drop by replacing a volume ΔV=1mm^3 of the interior of the drop by pure solvent. This step lasts about 1 s. To ensure a complete washing of the drop this procedure is repeated 450 times, so that the total volume exchanged is thirty times that of the drop (15 mm^3). The time evolution of the surface tension, before, during and after the washing procedure is measured.

2.2.3. Dilatational rheology measurements

We use the drop profile tensiometer to study the dilatational rheology of proteins at the air–water interface. To do so, an aqueous drop is perturbed by small harmonic oscillations of the interfacial area A leading to harmonic oscillations of the surface tension γ. From the Fourier transform F of the response relative to the perturbation the complex visco-elastic modulus E is calculated [19]:

$$E(i\omega) = \frac{F[\Delta\gamma]}{F[\ln(\Delta A)]} \quad (3)$$

where the real part, E', is the storage modulus that characterizes the dilatational interfacial elasticity, and the imaginary part, E'', is the loss modulus and is related to the dilatational interfacial viscosity. We impose relative deformations $\frac{\Delta A}{A}$ of 5%, respectively 10%, at a frequency of 0.025 Hz, respectively 0.05 Hz, for samples with bulk concentrations below, respectively above, 50 mg/ml. These parameters are chosen to optimize the quality of raw data while remaining in the linear regime of the response.

2.3. Wilhelmy plate tensiometry, ellipsometry and Brewster angle microscopy

Planar interfaces are characterized using a set-up that combines a Wilhelmy plate (KSV, Nima), a Brewster angle microscope (Optrel, Germany) and an ellipsometer (Optrel, Germany). The time evolution of the air-water interface is probed after a glass Petri dish of 17 cm diameter has been filled with protein solutions.

On the one hand, Brewster angle images are recorded using the ellipsometric device equipped with a 10X magnification objective and an acquisition camera. The contrast of the images is controlled by rotating the polarizer angle, the analyzer angle being kept constant (vertically polarized).

On the other hand, the optical profile and surface excess concentrations Γ of proteins at the air/water interface are measured by ellipsometry. Γ is defined as:

$$\Gamma = \int_{-\infty}^{0}(C(z)-C)dz + \int_{0}^{+\infty}C(z)dz \quad (4)$$

Here z is the axis normal to the interface (with the convention z > 0 in air) and z = 0 is the location of the Gibbs dividing surface, $C(z)$ is the solute concentration as a function of the distance z from the interface and C the solute concentration in the bulk solution [$C = C(z \ll 0)$].

An ellipsometer working with a green laser light (λ = 533 nm) is used to measure the quantities Ψ and Δ. Measurements are

performed at the incident angle $\varphi_{air} = 55°$. Ψ and Δ are related to the ratio of reflection field coefficients $\frac{r_p}{r_s}$ by:

$$\frac{r_p}{r_s} = \tan\Psi \exp i\Delta \tag{5}$$

Here r_p is the component of field reflection coefficient parallel to the reflection plane, and r_s is the component perpendicular to reflection plane. Data are analyzed in the framework of perturbation theory, which describes $\frac{r_p}{r_s}$ as the deviation from the reflection coefficient $\frac{r_{p,0}}{r_{s,0}}$ expected for a sharp step-like profile [20]:

$$\frac{r_p}{r_s} = \frac{r_{p,0}}{r_{s,0}} + \frac{2iQ_{air}}{r_{s,0}(Q_{air}+Q_{bulk})^2}\frac{K^2}{n_{air}^2 n_{bulk}^2} I_1 \tag{6}$$

Here $Q_{air} = 2\pi/(n_{air}\lambda)\cos\varphi_{air}$, $Q_{bulk} = 2\pi/(n_{bulk}\lambda)\cos\varphi_{bulk}$ and $K = 2n_{air}/\lambda \sin\varphi_{air}$, where n_{air}, and n_{bulk} are the refractive index of air and the bulk liquid phase; and φ_{air} and $\varphi_{bulk,}$ are the angles related by the Snell's law: $n_{air}\sin\varphi_{air} = n_{bulk}\sin\varphi_{bulk}$. The term I_1 is related to the interfacial optical profile as [20]:

$$I_1 = \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\frac{(\epsilon_\perp(z)-\epsilon_{air})(\epsilon_\perp(z)-\epsilon_{bulk})}{\epsilon_\perp(z)} + (\epsilon_\parallel - \epsilon_\perp)\right] dz \tag{7}$$

Here $\epsilon_\parallel$, respectively $\epsilon_\perp$, is the component of the dielectric constant parallel, respectively perpendicular, to the interface, and $\epsilon_i = n_i^2$.

If the interfacial layer is locally isotropic, $\epsilon_\parallel = \epsilon_\perp = \epsilon_L$, and Eq. (7) reads

$$I_1 = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{(\epsilon_L(z)-\epsilon_{air})(\epsilon_L(z)-\epsilon_{bulk})}{\epsilon_L(z)} dz \tag{8}$$

In the limit of optically thin interfacial layers, I_1 is related to the surface excess concentration measured by ellipsometry Γ_{elli}, which is approximately equal to the surface excess concentration Γ (Eq. (4):

$$I_1 \cong \Gamma_\epsilon \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{(\epsilon_L(z)-\epsilon_{air})}{\epsilon_L(z)} dz \cong \Gamma_\epsilon \frac{\epsilon_{bulk}-\epsilon_{air}}{\epsilon_{bulk}} \tag{9}$$

where $\Gamma_\epsilon = \int_{-\infty}^{\infty} (\epsilon_L(z)-\epsilon_{bulk})dz$ gives in a good approximation the dielectric constant surface excess. Finally, the surface excess concentration reads [21]:

$$\Gamma \cong \Gamma_{elli} = \frac{\Gamma_\epsilon}{\Delta\epsilon/\Delta C} = \cong \frac{I_1 \frac{\epsilon_{bulk}}{\epsilon_{bulk}-\epsilon_{air}}}{\Delta\epsilon/\Delta C} \tag{10}$$

3. Experimental results

3.1. Surface tension.

We show in Fig. 2a the time evolution of the air/water surface tension, γ, measured for several protein concentrations C in the aqueous phase, spanning more than 5 orders of magnitude (from 0.01 to 110 g/L), over a time scale ranging from 5 s to 10000 s, using the pendant drop tensiometry. We find that the surface tension of the solvent is constant ($\gamma_{solv} \approx 73$ mN/m) over the whole duration of the measurements, ensuring reliable data over the full time scale. For the lowest protein concentration (0.01 g/L), an induction period of about 50 s is observed during which the surface tension of the protein solution stays constant and equal to that of the solvent and then continuously decreases with time. For the other protein concentrations the induction period is too short to be measured with our experimental set-up. We find indeed that the surface tension at the shortest accessible time is systematically

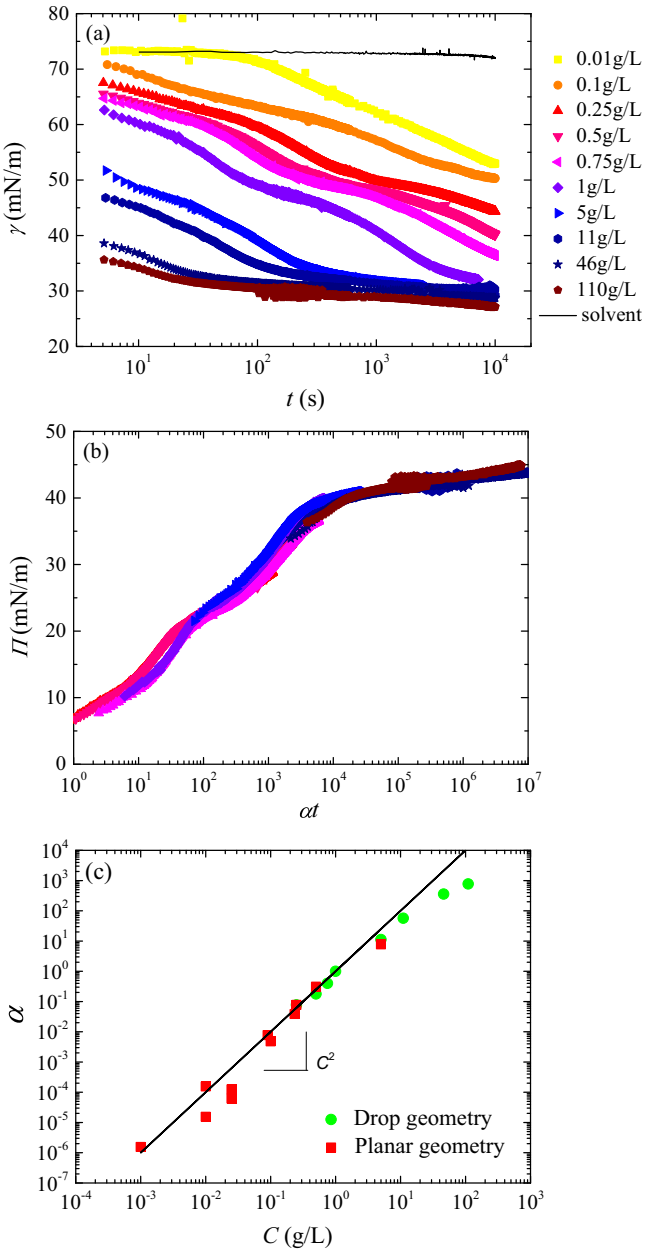


Fig. 2. (a) Time evolution of the surface tension for the solvent (thin black line) and for protein solutions at different protein concentrations C as indicated in the legend. Experiments were performed using the pendant drop tensiometer (drop geometry) (b) Master curve obtained by plotting the surface pressure as a function of a normalized time, αt, using $C = 1$ g/L as reference. All data except the two smallest concentrations (0.01 and 0.1 g/L) are shown. Symbols are the same as in (a). (c) Scale factor, α, as a function of protein concentration for measurements performed with drop and plane geometries. The line is the theoretical expectation for a diffusive process (Eq. (16)).

smaller than that of the solvent and decreases with the protein concentration. Note that several regimes of surface tension decrease with time can be identified in a semi-log scale.

Interestingly, all the data acquired for C > 0.1 g/L, overlap on a single master curve once plotted as a function of a normalized time αt, where t is the real time elapsed since the drop formation and α is a scale factor. We arbitrarily choose $C = 1$ g/L as the reference concentration (α=1). The scaling is shown in Fig. 2b where the surface pressure Π, is plotted as a function of αt. The master curve evidences two exponential growths of the surface pressure associated with characteristic times $\alpha t_1 = 500$ s and $\alpha t_2 = 19\,000$ s (fits not shown) followed by asymptotic logarithmic evolution. The scaling

does not hold for the two lowest protein concentrations (0.01 and 0.1 g/L). For these dilute solutions, the drop (typical volume 15 mm^3) does not constitute an infinite reservoir of protein, and the dynamic surface tension is expected to be strongly influenced by the depletion of proteins in the bulk due to their adsorption at the interface [22]. To overcome this problem and complete our experimental data in the low concentration limit, we perform similar measurements with a planar geometry, for bulk protein concentrations between 0.001 g/L and 10 g/L. In these conditions, a regime of infinite reservoir of proteins is systematically reached. We use a Petri dish filled with the protein solution and measure the surface tension as a function of time using a Wilhelmy plate. A master curve, surface pressure versus rescaled time αt, similar to that obtained in the pendant drop experiment, is also obtained. The scaling factors, α, used to build master curves with the experimental data collected in the two experimental geometries are displayed in Fig. 2c. We find that α increases as a power law of the concentration, $\alpha \sim C^p$ with $p = 1.9$. We note that this value is close to 2, the numerical value expected for a diffusive process. This point will be discussed below.

To address the reversibility of gliadin adsorption we measure the time evolution of the surface pressure after dilution of the bulk subphase. In the case of reversible adsorption, a decrease of the bulk concentration should lead to a decrease of the surface pressure [23]. This has been checked with a soluble surfactant (dodecyltrimethylammonium chloride, DTAC), ensuring the reliability of our experimental procedure (as detailed in the Materials and methods section). By contrast, in the case of gliadin, Π never decreases after washing, as shown in Fig. 3. Three experiments carried out at different stages of the time evolution of the surface pressure are presented. At low surface pressures ($\Pi = 11$ mN/m and $\Pi = 21$ mN/m), dilution of the bulk does not lead to any significant decrease of the surface pressure, although it dramatically reduces the rate of increase of the surface pressure. At high pressure (Π= 30 mN/m) dilution of the bulk turns out to have no effect on the increase rate of the surface pressure. Thus, our findings indicate that, at low pressure the evolution of Π is determined by protein transfer from the bulk to the interface, while at high pressure the further evolution of the pressure is independent of mass transfer to the interface. Moreover, since no decrease of the surface pressure could be evidenced, the desorption of the protein from interface is certainly extremely slow if ever it occurs. Adsorption of gliadins at interface can thus be safely considered as irreversible.

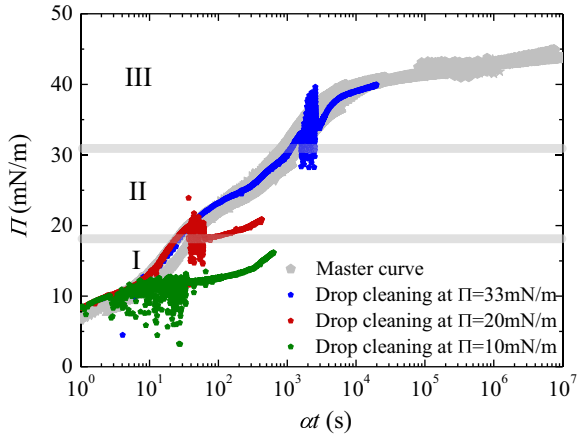


Fig. 3. Surface pressure as a function of the normalized time, αt. The gray data points correspond to the master curve shown in Fig. 2b. The colored symbols correspond to experiments where the interior of the drop has been washed at different surface pressures as indicated in the caption. The gray horizontal lines display the limits (Π_{c1} and Π_{c2}) of the different regimes identified by dilatational viscoelasticity and ellipsometry experiments.

3.2. Dilatational viscoelasticity of the protein interfacial layer

We measure the dilatational viscoelasticity of the interfacial layer at different times after the drop formation and for various protein concentrations in the subphase. We find that the viscoelastic measurements only depend on the surface pressure of the interface and that data collected at different protein concentrations (from 6.5 mg/L to 800 mg/L) reasonably fall onto a single master curve (Fig. 4). In the whole range of surface pressure investigated (5 mN/m < Π < 40 mN/m), the interfacial protein layer is essentially elastic with an elastic modulus, E', always larger than the loss modulus, E''. The elastic modulus varies non-monotonically with the surface pressure, and three regimes can be defined for the (E' vs Π) master curve. In regime I, $\Pi < \Pi_{c1} \approx 19$ mN/m, and regime III, $\Pi > \Pi_{c2} \approx 31$ mN/m, E' continuously increases with surface pressure, whereas in the intermediate regime ($\Pi_{c1} < \Pi < \Pi_{c2}$), E' decreases and reaches a minimum with Π. Interestingly the minimum of E' with the surface pressure is accompanied by a large increase of the loss modulus (Fig. 4b): the ratio E''/E' reaches about 0.4 in regime II, whereas this ratio is of the order of (0.1–0.15) in regimes I and III. Furthermore, it is worth mentioning that, in the intermediate regime, the collapse of the data collected at different protein concentrations is not as good as in the two other regimes, but instead the maximum of E''/E' seems to increase with C. The limits of these three regimes are also reported on the tensiometry plot that displays washing test in each regime (Fig. 3).

3.3. Optical properties of the protein interfacial layer.

The structure of the interfacial protein films prepared in Petri dishes is observed by Brewster angle microscopy. Fig. 5b displays characteristic images obtained for the 3 different regimes of surface pressure and viscoelasticity defined above. In all cases, the

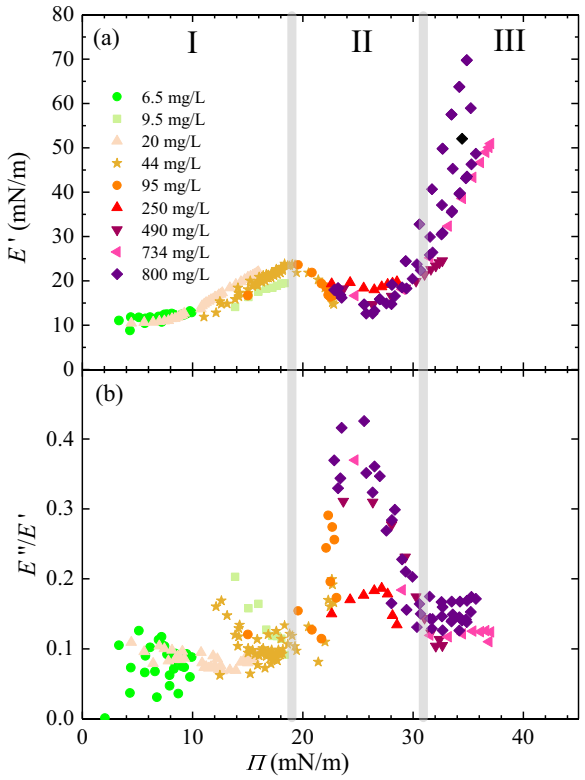


Fig. 4. Dilatational elastic modulus E' (a) and ratio between the viscous and elastic moduli, E''/E' (b) as a function of the surface pressure Π, for different protein concentrations as indicated in the legend. Thick gray lines delineate 3 regimes with cross-overs at Π_{c1} and Π_{c2}.

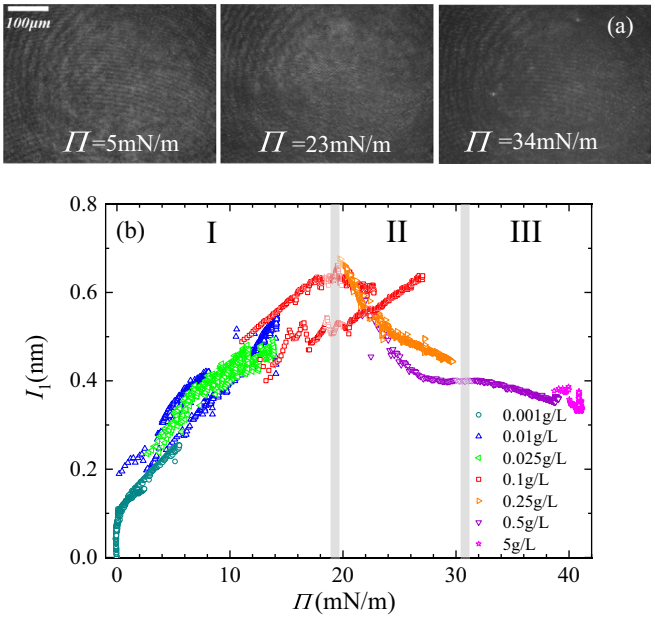


Fig. 5. (a) Typical Brewster angle microscopy images of the planar interface taken in the three regimes. From left to right, the polarizer angle is 5°, 10° and 15°. (b) Ellipsometric response, I_1, as a function of the surface pressure, Π, for different protein concentrations as indicated in the legend. Thick gray lines delineate the 3 regimes with cross-overs at Π_{c1} and Π_{c2}.

films appear very homogeneous at the microscopic scale. To get pictures with a good contrast it is necessary to adjust the polarizer angle from 0° to 15°. The increase of the brightness with surface pressure indicates an increase of surface reflectivity that we associate to an increase of the amount of proteins at the interface.

In order to quantitatively characterize the optical properties of the interfacial layer we use ellipsometry. Similarly to our findings for the viscoelastic properties, we measure that the structure of the interfacial layer only depends on the surface pressure and that data acquired at different protein concentrations for the subphase (in the range 0.001–5 g/L) collapse on a single curve (Fig. 5a). The ellipsometric signal, I_1, varies non-monotonically with Π, which allows distinguishing the same three regimes as before with the same cross-over pressures Π_{c1} and Π_{c2}. In regime I, I_1 increases with Π, whereas I_1 decreases with Π in regime II, and is more or less constant in regime III. In addition, we also observe a preliminary regime in which I_1 increases in time whereas the surface pressure is maintained at zero.

4. Discussion

We have investigated the interfacial properties of acidic solutions of gliadin studied over 5 decades of concentrations from 0.001 to 110 g/L. Gliadins adsorb irreversibly at the air-water interface in accordance with other studies on proteins [24]. The structural and viscoelastic properties of the interfacial gliadin film build up in a multistep process, the evolution of which is completely characterized by the surface pressure. The master curves obtained for the surface pressure, the viscoelasticity and the optical properties of the interfacial layer indicate that the properties at the air/water interface are determined by the concentration of the subphase and the time elapsed since the formation of the interface.

4.1. Adsorption kinetics

For low surface pressures, $\Pi < \Pi_{c1}$, the optical profile is assumed to be locally isotropic (and Eqs. (8)--(10) hold) because of the weak interaction between proteins, which are randomly oriented at the interface. We determine the surface excess concentration Γ according to Eq. (10). Fig. 6a displays the evolution of Γ as a function of time for three different concentrations, and for two sets of data for each concentration. We measure that the higher is the bulk concentration, the faster is the adsorption. Experimental data can be compared to an analytical model of diffusion-controlled adsorption kinetics [25]:

$$\Gamma(t) = \Gamma_m - \Gamma_m \exp\left(-2C/\Gamma_m\sqrt{\frac{Dt}{\pi}}\right) \tag{11}$$

With D the bulk protein diffusion coefficient and Γ_m the maximum surface excess concentration. Eq. (11) takes into account the decreasing difference of chemical potential of the proteins between bulk and interface along the adsorption process [26]. Hence at longer time and higher concentration, a steady state is reached with this model that takes into account saturation. Far from interface saturation on the other hand, when the chemical potential at interface can reasonably be considered as being constant, hence at short time and low concentration [27], Eq. (11) can be approximated as

$$\Gamma(t) = 2C\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \tag{12}$$

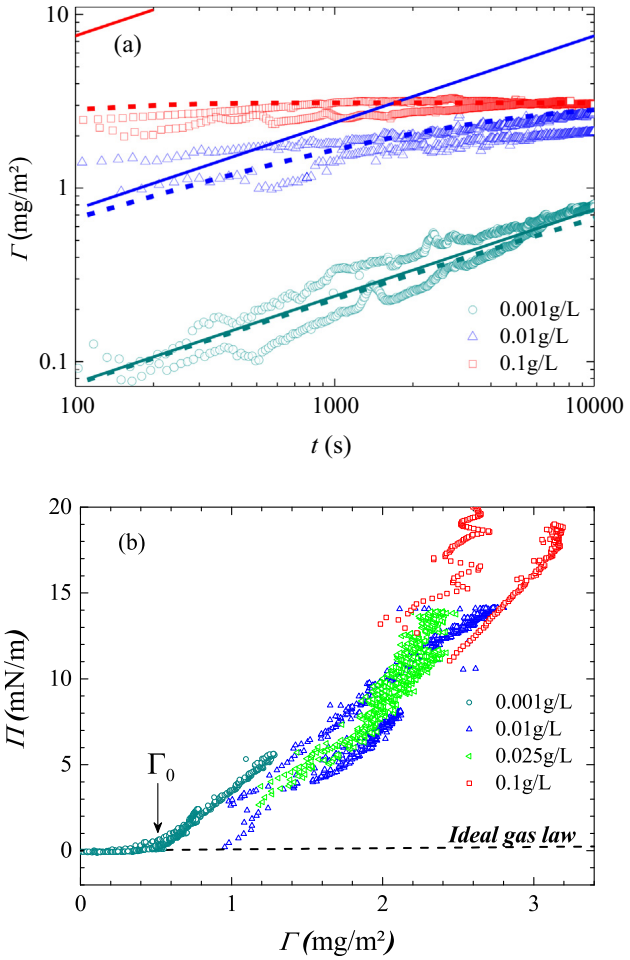


Fig. 6. (a) Surface excess concentration Γ as a function of time t. Symbols correspond to experimental data obtained by ellipsometry for different protein bulk concentrations as indicated in the caption. Dashed and continuous lines display diffusive models expressed in Eqs. (11) and (12) respectively. (b) Equation of state, surface pressure as a function of the surface excess concentration, in regime I.

Note that Eq. (12) is the short time limit of the Ward and Tordai model [28] that is classically used to model interfacial adsorption of surface active components. However, we do not use this model because it considers an instantaneous equilibrium of adsorbing species between the bulk and the interface and allows thus for back-diffusion which we have demonstrated to be negligible for gliadin at the air-water interface. The theoretical curves presented in the Fig. 6a are calculated using the bulk diffusion coefficient measured by dynamic light scattering and the maximum surface excess concentration measured at the end of regime I (D = 4.41 10^{-11} m^2/s and Γ_m =3.1 mg/m^2) and quantitatively compared to the experimental data. Overall a good agreement is found between the theoretical expectations and the experimental results (Fig. 6a). Eq. (12) account nicely for the experimental data measured at C = 0.001 g/L. Experimental data with C = 0.01 g/L and C = 0.1 g/L are instead better described taking into account a saturation (11).

4.2. Surface pressure master curve: time-concentration superposition

In line with those results, a time-concentration superposition is clearly evidenced, for the first time, to the best of our knowledge, for proteins at a liquid interface. It indicates that interfacial measurements performed with solutions at high protein concentration can predict the long ageing time behavior of interfaces formed from solutions at lower concentrations. The existence of a master curve furthermore indicates that the surface pressure obtained with a bulk concentration C and an elapsed time t can also be obtained with the reference concentration, C_{ref}, with an elapsed time t_{ref}:

$$\Pi(C,t) = \Pi(C_{ref}, t_{ref}) \tag{13}$$

$$\text{with } t_{ref} = \alpha t \tag{14}$$

With the assumption that only one surface concentration, Γ, is associated to a given surface pressure, Π, one can also write

$$\Gamma(C,t) = \Gamma(C_{ref}, t_{ref}) \tag{15}$$

According to the time evolution of the surface excess concentration in regime I, we have shown that the protein adsorption is controlled by diffusion. Combining the diffusion-controlled models previously introduced (Eqs. (11) and (12) with Eqs. (14) and (15), one derives the value of the scaling factor α:

$$\alpha = \left(\frac{C}{C_{ref}}\right)^2 \tag{16}$$

Fig. 2c shows that the theoretical prediction (Eq. (16)) with C_{ref}=1 g/L fits very nicely the experimental data over a 4 orders of magnitude for the protein bulk concentration (from 0.001 to 10 g/L). These concentrations cover regimes I and II, for which we have demonstrated, thanks to the droplet washing procedure, that the evolution of the interfacial pressure is mainly associated to protein adsorption. We mention that in the literature [29], the diffusion-controlled models were restricted to dilute regimes. Ybert and di Meglio [29a] previously performed a time-concentration rescaling of tensiometry data for bovine serum albumin at an air/water interface but were puzzled by the correspondence between curves at high surface pressure as they expected dynamics to be governed by adsorption mechanisms. In the case of gliadins the adsorption of additional proteins to an already relatively dense interface appears not to be the limiting step, even when the protein concentration at the interface is relatively large (excess surface concentration >3 mg/m^2). We think that the diffusive protein mass transfer remains possible thanks to the creation of free space at the interface with the reorganization of proteins previously adsorbed due to the protein crowding. So, the propensity of gliadins to easily reorganize at interfaces could explain this behavior. In line with our physical picture, Miura et al [30] showed by simulations that the overall adsorption kinetics of chain molecules on a surface is not strongly affected by their internal reorganization. They rationalized their result using a theoretical model that considers bulk diffusion, Langmuir adsorption and rearrangement of anisotropic molecules through a second order reaction.

On the other hand, for higher concentrations, we measure that α is smaller than theoretically expected for a diffusive process, showing that the increase of bulk protein concentration does not speed up the time evolution of the surface pressure as much as expected for a purely diffusion-controlled process. For these concentrations, the shift factor is determined according to surface tension profiles dominated by the regime III that is very rapidly reached. In this regime, the drop washing test showed that adsorption is not involved, explaining the discrepancy between α determined at high concentration and the model. Overall, we show that the surface tension dynamics is controlled by bulk diffusion of gliadin toward the air-water interface at short times (low surface pressures), during regime I, but also during regime II.

4.3. Surface excess concentration and protein conformational changes by ellipsometry

Thanks to the concomitant measurement of the surface pressure and surface excess concentration, the surface pressure isotherm of gliadin proteins at the air-water interface, Π versus Γ, can also be plotted for $\Pi < \Pi_{c1}$ (Fig. 6b). In the early regime, below Γ_0 = 0.5 mg/m^2 (which corresponds to a surface of 116 nm^2 occupied on average by each protein), no evolution of the surface pressure could be measured due to the high molecular weight of the surface active species. According to the ideal gas law a very weak dependence of the surface pressure with the surface excess concentration is predicted in this concentration range: $\Pi = RT\Gamma/M_w$, with R the ideal gas constant, T the temperature and M_w the molecular weight of the species adsorbed at the interface. For objects with M_w = 35 000 g/mol (Fig. 1), one predicts $\Pi = 0.07\Gamma$, i.e. a surface pressure of 3.5 10^{-2} mN/m for Γ_0 = 0.5 mg/m^2. Such low value is not measurable with our technique (see line of the ideal gas law in Fig. 6).

For $\Gamma > \Gamma_0$, the surface pressure increases faster with the surface concentration as a result of proteins interactions. The pressure increases linearly with Γ up to a value of Γ_{max} = 3.1 mg/m^2 that we considered as the saturation. Modeling the protein layer as a monolayer of hard spheres of constant thickness h, at maximal packing, the protein volume fraction at interface is ϕ_L = 0.6. Using $\Gamma = \rho h \phi_L$ at saturation, with the protein relative density $\rho = 1.32$, we find that the thickness of the film is h = 4 nm. This value is consistent with the size of gliadins, as measured by dynamic light scattering. The preliminary regime, characterized by a negligible surface pressure, corresponds to a gas regime in which proteins adsorb on a nearly "free interface" whereas in the regime I proteins adsorb on an interface already covered by interacting proteins.

In regime II, the ellipsometric signal I_1 decreases while the surface pressure increases. In this regime, Eqs. (8)–(10) do not hold anymore because the surface concentration cannot decrease if the surface pressure increases. In the absence of desorption, such behavior can only be accounted for by a conformational change of the interfacial layer. Hypotheses of formation of chain loops or multilayer in the bulk can be safely discarded as such processes would lead to constant or increasing I_1 according to Eq. (8). Partial protein dehydration or the development of an anisotropic refractive index in the interfacial layer is instead consistent with the decrease of I_1 as detailed below.

In the hypothesis of a progressive dehydration and protrusion of proteins in air, Eq. (9) cannot be used. A two-step dielectric constant profile for the protein film with a constant thickness h is assumed. We define ψ_{air} as the fraction of the thickness of the interfacial protein film in air. The protein film is therefore decomposed into the sum of a layer of thickness $h\,\psi_{air}$ in air, and a layer of thickness $h\,(1-\psi_{air})$ in the solvent. Eq. (8) thus becomes

$$I_1 = I_1^{air} + I_1^{solv} \tag{17}$$

with

$$I_1^{air} = \frac{\left(n_{protair}^2 - n_{air}^2\right)\left(n_{protair}^2 - n_{bulk}^2\right)}{n_{protair}^2}\psi_{air}h \tag{18}$$

and

$$I_1^{solv} = \frac{\left(n_{protsolv}^2 - n_{air}^2\right)\left(n_{protsolv}^2 - n_{bulk}^2\right)}{n_{protsolv}^2}(1-\psi_{air})h \tag{19}$$

Here, n_{air} is the index of refraction of air, n_{bulk} is the index of refraction of the subphase, as measured experimentally (Eqs. (1) and (2)). $n_{protair}$, respectively $n_{protsolv}$, is the index of refraction of the protein layer in air, respectively solvent. Following Eq. (2),

$$n_{protair}^2 = n_{air}^2 + \phi_L(n_{prot}^2 - n_{air}^2) \tag{20}$$

and

$$n_{protsolv}^2 = n_{solv}^2 + \phi_L(n_{prot}^2 - n_{solv}^2) \tag{21}$$

with ϕ_L the volume fraction of proteins in the interfacial layer. Whatever ϕ_L, $I_1^{air} < I_1^{solv}$. As a consequence, the decrease of I_1 observed in regime II could be accounted by an increase of ψ_{air} and associated to protein dehydration. Considering $\phi_L = 0.6$ and $h = 4$nm (the numerical values found at the end of regime I), we estimate that ψ_{air} continuously increases in regime II and at the end of this regime reaches $\psi_{air}^{max} = 0.34$. Here we assume that the amount of protein at the interface is constant and equal to its value at the transition from regime I to regime II, while further protein adsorption should contribute in this regime according to drop washing test. $\Delta\psi_{air}^{max}$ is thus presumably underestimated. However, this value can be compared to the proportion of hydrophobic residues in gliadin sequences that is about one third.

An alternative model is to suppose that the refractive index of the protein interfacial film becomes anisotropic, due to the alignment of the proteins in the film. Such alignment seems realistic considering that gliadins are usually modeled as prolate ellipsoids [15]. This would induce a decrease of I_1 with the development of anisotropy of the refractive index of the protein layer. According to Eq. (7), for one slab dielectric constant profile of the protein film of thickness h, Eq. (7) reads:

$$I_1 = \left[\frac{\left(n_\perp^2 - n_{air}^2\right)\left(n_\perp^2 - n_{bulk}^2\right)}{n_\perp^2} + \Delta(n^2)\right]h \tag{22}$$

Here $\Delta(n^2) = {n_\parallel}^2 - n_\perp^2$, where $n_\perp$(resp. $n_\parallel$) is the index of refraction of the protein layer orthogonal to (resp. in the plane of) the film. Considering $\phi_L = 0.6$ and $h = 4$nm (the numerical values found at the end of regime I), and a constant index of refraction perpendicular to the film $n_\perp$ equal to the index of refraction of gliadin solution at $\phi_L = 0.6$ ($n_\perp = 1.46$), we estimate that $\Delta(n^2)$ continuously decreases in regime II and reaches a value $\Delta(n^2)^{max} = -0.0625$, or equivalently $\Delta n^{max} = n_\perp - n_\parallel^{max} = -0.02$ at the end of regime II. Assuming ϕ_L constant in this regime, instead of increasing, may underestimate the latter value. However, the order of magnitude appears reasonable in comparison with measurements obtained for flagellin proteins on a hydrophobic surface by optical waveguide light mode spectroscopy ($\Delta n = -0.015$) [31]. Finally, in regime III, the value of I_1 is roughly constant indicating that the interfacial optical profile is not modified by the increase of interfacial pressure.

4.4. Interfacial regimes

To summarize, the dynamical properties distinguish three main regimes (hereafter referred to as regimes I, II and III) while optical properties reveal a preliminary regime in addition.

In the preliminary regime (regime 0) ellipsometry data show that proteins start to adsorb. However, a null surface pressure is measured. The negligible surface pressure indicates that proteins are in a very dilute regime at the air-water interface. This regime occurs during the so-called induction time of tensiometry kinetics [32] and can only be observed with the lowest bulk concentration (0.001 g/L).

In regime I, $0 < \Pi < 19$ mN/m, proteins continue to adsorb but progressively start to interact with each other at the interface as probed by the linear increase of surface concentration and dilatational elasticity with the surface pressure. Dilatational viscoelastic master curves with a similar regime were previously described in different studies [3b,33]. Interestingly, the behavior of gliadin displays similarities with that of soft proteins like β-casein. Indeed, the maximum value of E' at the transition between regimes I and II is relatively weak (26 mN/m), and comparable to that measured for β-casein at an air/water interface (20–30 mN/m) [34], whereas larger values (typically 70–80 mN/m) were reported for several globular/hard proteins [3b]. In addition, the proportionality constant between E' and Π (i.e. the slope of the E' vs Π plot) is quite small (approximately 1). According to polymer scaling laws, this low value would be associated to the weak compactness of proteins at interface [3c,34]. This weak compactness would induce soft rearrangements of proteins at the interface that are in line with the model of Lucassen-Reynders *et al* [3b]. In this model, proteins are assumed to be able to adopt smaller molecular area with increasing surface pressure, a wider range of conformations being adopted by soft proteins that are more compressible because of their flexible structures. In addition, it was previously demonstrated by a polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) study that, at the air-water interface, gliadins, which are initially weakly folded and flatly oriented at low surface pressure, progressively fold and orientate their secondary structures as surface pressure increases [35].

In regime II, $19 < \Pi < 31$ mN/m, a master curve can be plotted with viscoelastic data, even if the maximum of E''/E' slightly increases with the bulk concentration. This behavior, analogous to the one observed for β-lactoglobulin [33c,33e], can be attributed to the fast interfacial adsorption of proteins with high bulk concentration that would result in more disordered films, more prompt to relax with the oscillatory dilatational stress. The general increase of dilatational dissipative viscoelastic properties associated with an anomalous pressure dependence of the optical profile suggests a significant change of protein conformation. In the literature [33c,34,36], the decrease of E' is associated to relaxation processes. Different processes are proposed: reorientation, internal reconformation (formation of loops in the bulk or in air, are specific cases of reconformation), phase transition, formation of 3D structures at the interface, collapse. However, it is very difficult to experimentally prove the exact physical processes involved in the relaxation. In our work, thanks to the combination of different techniques we are able to discard the formation of multilayer and loops in the bulk subphase and their collapse as possible processes. We propose two models to rationalize our ellipsometric data, assuming either a progressive dehydration of the proteins as water is not a good solvent for

gliadin or the development of anisotropy for the protein refractive index resulting from the anisotropic shape of gliadin protein [15,37]. Both processes were previously identified for several proteins at the air water interface by neutron or X-ray reflectivity [38]. Even if the numerical values obtained with the reorientation model seem more realistic that those obtained with the partial dehydration model, we expect that a more complex behavior involving both phenomena might occur. Overall, our experimental data demonstrate that significant conformational changes occur in regime II, induced by the surface pressure, due to thermodynamics [39].

Both regimes I and II are related to a protein mass transfer from the bulk to the interface that is controlled by diffusion. By contrast, in regime III, $\Pi > 31$ mN/m, no protein adsorption is required to induce the surface pressure evolution. In addition, a drastic increase of the elastic modulus E' with Π is measured, signing the increasing incompressibility of the interfacial film, while a constant optical profile is observed. We attribute this regime to ageing of the protein film at the air-water interface. A modification of interactions inside the protein film with time can be at the origin of the behavior observed. Gelation phenomena could occur but interfacial shear rheology would be required to fully characterize it.

The sequence of three regimes, adsorption-reorganization-gelation, was previously proposed for different proteins at interfaces [40]. However, generally the shape of dynamic interfacial tension displays only one decay step. The induction time (during which surface pressure $\Pi \approx 0$) was associated to protein adsorption, the steep increase of surface pressure with time being associated to protein relaxation and the final slow increase of surface pressure being associated to gelation. This interpretation was only based on surface tension measurements and quite speculative while the combination of techniques used in our study gives more credit to our interpretation. Note finally that three comparable regimes were previously identified for gliadins in the bulk [9]. Upon osmotic compression, after a dilute regime of repulsive colloids, a highly compressible regime with secondary structure changes was evidenced, and followed by a regime of strongly interacting proteins.

5. Conclusion

We have studied the adsorption of gliadin proteins at the air-water interface from acidic protein solutions over a broad range of concentrations. Combination of dilatational viscoelastic measurements and optical profile measurements provides a consistent physical picture of the three steps process, as summarized in Fig. 7. In the preliminary regime (regime 0, not represented), the surface pressure is equal to zero and proteins start to adsorb on a very dilute interface. Then, in the first regime, at small surface pressure Π (regime I), the ellipsometric signal I_1 and the elastic modulus E' increase with the surface pressure, while the loss modulus E" remains small. This regime corresponds to a progressive coverage of the interface by individual weakly interacting flexible proteins, up to a critical surface pressure Π_{c1}. The second regime ($\Pi_{c1} < \Pi < \Pi_{c2}$) results from significant conformational rearrangements of the protein film induced by further protein adsorption, which are identified by a strong increase of the dissipative viscoelastic properties of the film concomitantly with an anomalous evolution of its optical profile. Finally, in regime III ($\Pi > \Pi_{c2}$), the ellipsometric signal does not evolve with the surface pressure, suggesting that the structure of the interfacial layer does not change significantly. In this regime, on the other hand, a dramatic increase of the elastic modulus is measured while no further adsorption occurs. The two experimental observations can be consistently interpreted as resulting from ageing of the interfacial layer.

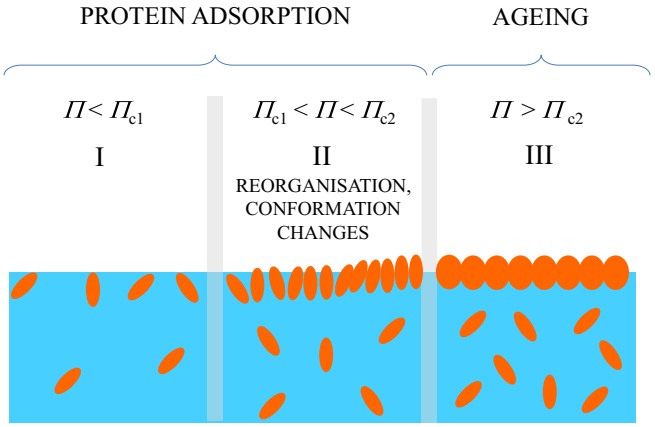


Fig. 7. Scheme of the three interfacial regimes identified thanks to structural and rheological measurements of the gliadin air/water interface. The three regimes are defined by the interfacial pressure.

The softness of gliadins, which we have evidenced at the air/water interface, is presumably linked to its partially disordered secondary structure due to the abundance of proline and glycin residues in the repetitive domains of their primary sequence. This behavior could be associated to the biological function of these proteins that is to store amino-acid for the future development of the plant in the wheat grain. An efficient accumulation of proteins in a minimum volume should be reached thanks to their capacity to reorganize with an increasing osmotic pressure. Furthermore, from an industrial point of view, the gliadin softness is a clear asset as it should limit emulsion drop breakup in shear flow as demonstrated for a model flexible protein by Erni et al [41].

Acknowledgments

This work was performed, in partnership with the SAS PIVERT, within the frame of the French Institute for the Energy Transition (ITE P.I.V.E.R.T., www.institut-pivert.com) selected as an Investment for the Future by the French Government under the reference ANR-001-01.We thank Marie-Hélène Morel for the development of gliadin extraction and the HPLC measurements. We also acknowledge the Laboratory of Excellence NUMEV (ANR-10-LAB-20) for partial funding of the Brewster Angle Microscope.

References

[1] D. Langevin, Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties, Adv. Colloid Interface 88 (1–2) (2000) 209–222.
[2] E. Dickinson, Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology, Colloid Surf. B 15 (2) (1999) 161–176.
[3] (a) M.A. Bos, T. van Vliet, Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review, Adv. Colloid Interface 91 (3) (2001) 437–471;
(b) E.H. Lucassen-Reynders, J. Benjamins, V.B. Fainerman, Dilational rheology of protein films adsorbed at fluid interfaces, Curr. Opin. Colloid In 15 (4) (2010) 264–270;
(c) R. Douillard, M. Daoud, V. Aguie-Beghin, Polymer thermodynamics of adsorbed protein layers, Curr. Opin. Colloid In 8 (4–5) (2003) 380–386.
[4] (a) V. Ducel, J. Richard, Y. Popineau, F. Boury, Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface, Biomacromolecules 5 (6) (2004) 2088–2093;
(b) J.M. Wang, N. Xia, X.Q. Yang, S.W. Yin, J.R. Qi, X.T. He, D.B. Yuan, L.J. Wang, Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: relationship to structural properties, J. Agr. Food Chem 60 (12) (2012) 3302–3310;
(c) B. Berecz, E.N.C. Mills, L. Tamas, F. Lang, P.R. Shewry, A.R. Mackie, Structural stability and surface activity of sunflower 2S albumins and nonspecific lipid transfer protein, J. Agr. Food Chem. 58 (10) (2010) 6490–6497;
(d) J.M.R. Patino, C.C. Sanchez, S.E.M. Ortiz, M.R.R. Nino, M.C. Anon, Adsorption of soy globulin films at the air-water interface, Ind. Eng. Chem. Res. 43 (7) (2004) 1681–1689.

[5] J. Ornebro, T. Nylander, A.C. Eliasson, Interfacial behaviour of wheat proteins, J. Cereal Sci. 31 (2) (2000) 195–221.
[6] N.W.A.A.A.E. Tschoegl, The surface chemistry of wheat gluten II. Measurements of surface viscoelasticity, J. Colloid Sci. 15 (2) (1960) 168–182.
[7] M. Dahesh, A. Banc, A. Duri, M.H. Morel, L. Ramos, polymeric assembly of gluten proteins in an aqueous ethanol solvent, J. Phys. Chem. B 118 (38) (2014) 11065–11076.
[8] D.M.R. Georget, P.S. Belton, Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy, Biomacromolecules 7 (2) (2006) 469–475.
[9] A. Boire, P. Menut, M.H. Morel, C. Sanchez, Osmotic Compression of Anisotropic Proteins: Interaction Properties and Associated Structures in Wheat Gliadin Dispersions, J. Phys. Chem. B 119 (17) (2015) 5412–5421.
[10] (a) T. Mita, K. Nikai, T. Hiraoka, S. Matsuo, H. Matsumoto, Physicochemical Studies on Wheat-Protein Foams, J Colloid Interf Sci 59 (1) (1977) 172–178;
(b) R.C.A. Keller, R. Orsel, R.J. Hamer, Competitive adsorption behaviour of wheat flour components and emulsifiers at an air-water interface, J Cereal Sci 25 (2) (1997) 175–183.
[11] M.A. Bos, B. Dunnewind, T. van Vliet, Foams and surface rheological properties of beta-casein, gliadin and glycinin, Colloid Surface B 31 (1–4) (2003) 95–105.
[12] K. Takeda, Y. Matsumura, M. Shimizu, Emulsifying and surface properties of wheat gluten under acidic conditions, J Food Sci 66 (3) (2001) 393–399.
[13] (a) D.F. Peng, W.P. Jin, J. Li, W.F. Xiong, Y.Q. Pei, Y.T. Wang, Y. Li, B. Li, Adsorption and Distribution of Edible Gliadin Nanoparticles at the Air/Water Interface, J Agr Food Chem 65 (11) (2017) 2454–2460;
(b) B.G. Thewissen, I. Celus, K. Brijs, J.A. Delcour, Foaming Properties of Wheat Gliadin, J Agr Food Chem 59 (4) (2011) 1370–1375.
[14] M. Dahesh, A. Banc, A. Duri, M.H. Morel, L. Ramos, Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent, Food Hydrocolloid 52 (2016) 1–10.
[15] N.H. Thomson, M.J. Miles, Y. Popineau, J. Harries, P. Shewry, A.S. Tatham, Small angle X-ray scattering of wheat seed-storage proteins: alpha-, gamma- and omega-gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenin, Bba-Protein Struct M 1430 (2) (1999) 359–366.
[16] Z. Zhang, M.G. Scanlon, Solvent effects on the molecular structures of crude gliadins as revealed by density and ultrasound velocity measurements, J Cereal Sci 54 (2) (2011) 181–186.
[17] D.E. Aspnes, Optical-Properties of Thin-Films, Thin Solid Films 89 (3) (1982) 249–262.
[18] T.B. Robertson, J.E. Greaves, On the refractive indices of solutions of certain proteins. V. Gliadin, J Biol Chem 9 (3) (1911) 181–184.
[19] G.P.P. Loglio, R. Miller, A.V. Makievski, F. Ravera, M. Ferrari, L. Liggieri, Drop and bubble shape analysis as tool for dilatational rheology of interfacial layers, in: R.M. D. Möbius (Ed.), Novel Methods to Study Interfacial Layers, Elsevier, 2001.
[20] J. Lekner, Theory of Reflection, Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, 1987.
[21] (a) A. Stocco, K. Tauer, S. Pispas, R. Sigel, Dynamics of amphiphilic diblock copolymers at the air-water interface, J Colloid Interf Sci 355 (1) (2011) 172–178;
(b) P. Ramirez, A. Stocco, J. Munoz, R. Miller, Interfacial rheology and conformations of triblock copolymers adsorbed onto the water-oil interface, J Colloid Interf Sci 378 (2012) 135–143.
[22] T. Kairaliyeva, E.V. Aksenenko, N. Mucic, A.V. Makievski, V.B. Fainerman, R. Miller, Surface Tension and Adsorption Studies by Drop Profile Analysis Tensiometry, J Surfactants Deterg 20 (6) (2017) 1225–1241.
[23] J.K. Ferri, N. Gorevski, C. Kotsmar, M.E. Leser, R. Miller, Desorption kinetics of surfactants at fluid interfaces by novel coaxial capillary pendant drop experiments, Colloid Surface A 319 (1–3) (2008) 13–20.
[24] (a) E.M. Freer, K.S. Yim, G.G. Fuller, C.J. Radke, Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: comparison of shear and dilatation deformation, J. Phys. Chem. B 108 (12) (2004) 3835–3844;
(b) V. Mitropoulos, A. Mutze, P. Fischer, Mechanical properties of protein adsorption layers at the air/water and oil/water interface: a comparison in light of the thermodynamical stability of proteins, Adv. Colloid Interface 206 (2014) 195–206;
(c) D.E. Graham, M.C. Phillips, Proteins at Liquid Interfaces. 1. Kinetics of adsorption and surface denaturation, J. Colloid Interf. Sci. 70 (3) (1979) 403–414.
[25] T. Miura, K. Seki, Diffusion influenced adsorption kinetics, J. Phys. Chem. B 119 (34) (2015) 10954–10961.
[26] J.F. Douglas, H.E. Johnson, S. Granick, A simple kinetic-model of polymer adsorption and desorption, Science 262 (5142) (1993) 2010–2012.
[27] I. Langmuir, V.J. Schaefer, The effect of dissolved salts on insoluble monolayers, J. Am. Chem. Soc. 59 (1937) 2400–2414.
[28] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time-dependence of boundary tensions of solutions. 1. the role of diffusion in time-effects, J. Chem. Phys. 14 (7) (1946) 453–461.
[29] (a) C. Ybert, J.M. di Meglio, Study of protein adsorption by dynamic surface tension measurements: diffusive regime, Langmuir 14 (2) (1998) 471–475;
(b) F.K. Hansen, R. Myrvold, The kinetics of albumin adsorption to the air/water interface measured by automatic axisymmetric drop shape analysis, J. Colloid Interf. Sci. 176 (2) (1995) 408–417;
(c) M. Paulsson, P. Dejmek, Surface-film pressure of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum-albumin at the air-water-interface studied by wilhelmy plate and drop volume, J. Colloid Interf. Sci. 150 (2) (1992) 394–403.
[30] T. Miura, K. Seki, Effects of surface affinity on the ordering dynamics of self-assembled monolayers of chain molecules: transition from a parallel to a perpendicular structure, Phys. Rev. E 91 (5) (2015).
[31] N. Kovacs, D. Patko, N. Orgovan, S. Kurunczi, J.J. Ramsden, F. Vonderviszt, R. Horvath, Optical anisotropy of flagellin layers. in situ and label-free measurement of adsorbed protein orientation using OWLS, Anal. Chem. 85 (11) (2013) 5382–5389.
[32] R. Miller, V.B. Fainerman, E.V. Aksenenko, M.E. Leser, M. Michel, Dynamic surface tension and adsorption kinetics of beta-casein at the solution air interface, Langmuir 20 (3) (2004) 771–777.
[33] (a) J. Benjamins, A. Cagna, E.H. LucassenReynders, Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins, Colloid Surf. A 114 (1996) 245–254;
(b) J. Benjamins, E.H.L. Reynders, Static and dynamic properties of proteins adsorbed at three different liquid interfaces, Roy. Soc. Ch. (284) (2003) 216–225;
(c) J. Benjamins, J. Lyklema, E.H. Lucassen-Reynders, Compression/expansion rheology of oil/water interfaces with adsorbed proteins. Comparison with the air/water surface, Langmuir 22 (14) (2006) 6181–6188;
(d) R. Miller, J.K. Ferri, A. Javadi, J. Kragel, N. Mucic, R. Wustneck, Rheology of interfacial layers, Colloid Polym. Sci. 288 (9) (2010) 937–950;
(e) V. Ulaganathan, I. Retzlaff, J.Y. Won, G. Gochev, D.Z. Gunes, C. Gehin-Delval, M. Leser, B.A. Noskov, R. Miller, Beta-Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 2. dilational rheology: effect of pH and ionic strength, Colloid Surf. A 521 (2017) 167–176.
[34] P. Cicuta, I. Hopkinson, Studies of a weak polyampholyte at the air-buffer interface: the effect of varying pH and ionic strength, J. Chem. Phys. 114 (19) (2001) 8659–8670.
[35] A. Banc, B. Desbat, D. Renard, Y. Popineau, U. Mangavel, L. Navailles, Structure and orientation changes of omega- and gamma-gliadins at the air-water interface: a PM-IRRAS Spectroscopy and Brewster angle microscopy study, Langmuir 23 (26) (2007) 13066–13075.
[36] A. Hambardzumyan, V. Aguie-Beghin, M. Daoud, R. Douillard, beta-casein and symmetrical triblock copolymer (PEO-PPO-PEO and PPO-PEO-PPO) surface properties at the air-water interface, Langmuir 20 (3) (2004) 756–763.
[37] S. Ang, J. Kogulanathan, G.A. Morris, M.S. Kok, P.R. Shewry, A.S. Tatham, G.G. Adams, A.J. Rowe, S.E. Harding, Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation, Eur. Biophys. J. Biophy. 39 (2) (2010) 255–261.
[38] (a) J.R. Lu, T.J. Su, R.K. Thomas, J. Penfold, J. Webster, Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection, J. Chem. Soc. Faraday T. 94 (21) (1998) 3279–3287;
(b) I.M. Tucker, J.T. Petkov, J. Penfold, R.K. Thomas, A.R. Cox, N. Hedges, Adsorption of hydrophobin-protein mixtures at the air-water interface: the impact of pH and electrolyte, Langmuir 31 (36) (2015) 10008–10016;
(c) J.R. Lu, S. Perumal, X.B. Zhao, F. Miano, V. Enea, R.R. Heenan, J. Penfold, Surface-induced unfolding of human lactoferrin, Langmuir 21 (8) (2005) 3354–3361;
(d) Y.F. Yano, Y. Kobayashi, T. Ina, K. Nitta, T. Uruga, Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air-water interface, Langmuir 32 (38) (2016) 9892–9898.
[39] P. Joos, G. Serrien, The principle of Braun-Le Chatelier at surfaces, J Colloid Interf. Sci. 145 (1) (1991) 291–294.
[40] C.J. Beverung, C.J. Radke, H.W. Blanch, Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements, Biophys. Chem. 81 (1) (1999) 59–80.
[41] P. Erni, E.J. Windhab, P. Fischer, Emulsion drops with complex interfaces: globular versus flexible proteins, Macromol. Mater. Eng. 296 (3–4) (2011) 249–262.

4.2 Déplétion du volume, effet de courbure

La construction de la courbe maîtresse de pression de surface avec la méthode de la goutte pendante n'est pas possible avec les données obtenues pour des concentrations d'isolat protéique en volume $C < 0.1$ g/L. Les mesures à temps long à basses concentrations ne coïncident pas avec les mesures à temps courts obtenues avec des concentrations $C \geq 0.1$ g/L. Cela est attribué à un effet de déplétion des protéines en solution non négligeable lorsque la concentration protéique initiale en solution est trop faible. Afin d'estimer la concentration d'isolat protéique en volume en dessous de laquelle l'effet de déplétion n'est pas négligeable dans nos mesures, on calcule la concentration superficielle d'excès en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume en considérant que la totalité de l'isolat est adsorbée à l'interface. On considère l'interface air/eau (a/e) avec deux géométries :

— la goutte pendante où le volume est $V_g = 17$ mm^3 et la surface $S_g = 30$ mm^2.

— Le plan où la plaque de Wilhelmy baigne dans un solvant de volume $V_p = 10^5$ mm^3 et de surface $S_p = 2.3 \times 10^4$ mm^2.

Puisque le rapport surface sur volume est plus faible pour la géométrie plan, il faut une concentration en volume plus faible qu'en géométrie goutte pour atteindre une concentration superficielle donnée en supposant que toutes les protéines en solution sont toutes adsorbées.

La figure 4.1 montre la concentration superficielle d'excès obtenue en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume lorsque la totalité des protéines est adsorbée à l'interface. Pour obtenir une concentration superficielle d'excès saturante $\Gamma_m = 3$ mg/m^2, il faut une concentration d'isolat protéique en volume $C = 7 \times 10^{-4}$ g/L en géométrie plan et $C = 5 \times 10^{-3}$ g/L en géométrie goutte pendante. On suppose donc que pour des concentrations d'un ordre de grandeur plus grand, c'est à dire $C \geq 7 \times 10^{-3}$ g/L pour la géométrie plan et $C \geq 5 \times 10^{-2}$ g/L pour la géométrie goutte, l'effet

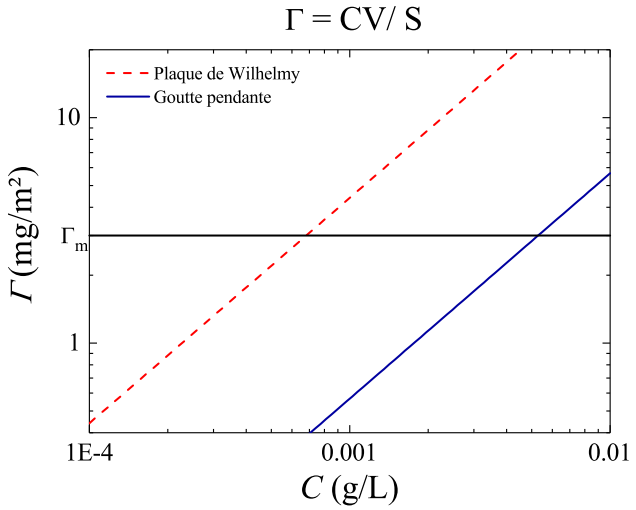


Fig. 4.1: Concentration superficielle d'excès en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume en considérant que la totalité de l'isolat est adsorbée à l'interface. Le trait horizontal montre $\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2.

de déplétion est négligeable pour atteindre une monocouche interfaciale saturée.

Ainsi, pour obtenir la mesure de facteur d'échelle à des concentration $C < 0.1$ g/L on utilise la géométrie plan. La figure 4.2 (a) montre les courbes maîtresses de pressions de surface obtenues par géométrie goutte et plan. On observe que pour les concentrations d'isolat protéique en volume $C > 0.25$ g/L, les courbes maîtresses des deux géométries sont similaires et se recouvrent. Pour $C < 0.25$ g/L, la pression de surface est plus élevée en géométrie plan. Ce non recouvrement des courbes maîtresses en géométrie goutte et plan est attribué à l'effet de courbure [188] :

$$\Gamma(t) = 2C\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \pm \frac{CD}{R}t \tag{4.1}$$

Où Γ est la concentration superficielle d'excès, D le coefficient de diffusion du composé amphiphile, t le temps, R le rayon correspondant à la courbure de l'interface, il est négatif si le composé amphiphile vient de l'intérieur et positif si le composé amphiphile arrive de l'extérieur à l'interface.

Lorsque l'on considère la courbure de l'interface, $\Gamma(t)$ est ralentit lorsque les protéines arrivent de l'intérieur (cas d'une goutte de solution) et accélérée lorsque les protéines arrive de l'extérieur (cas d'une bulle dans la solution).

La figure 4.2 (b) montre les facteurs d'échelle en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume pour les mesures en goutte pendante (ronds vides bleus) et géométrie plan (ronds pleins rouges) . Les facteurs d'échelles utilisés pour la construction des courbes maîtresses suivent le modèle diffusif et ont des valeurs similaires aux mêmes concentrations d'isolat protéique en volume. Cela est une indication de la fiabilité des mesures pour ces deux géométries.

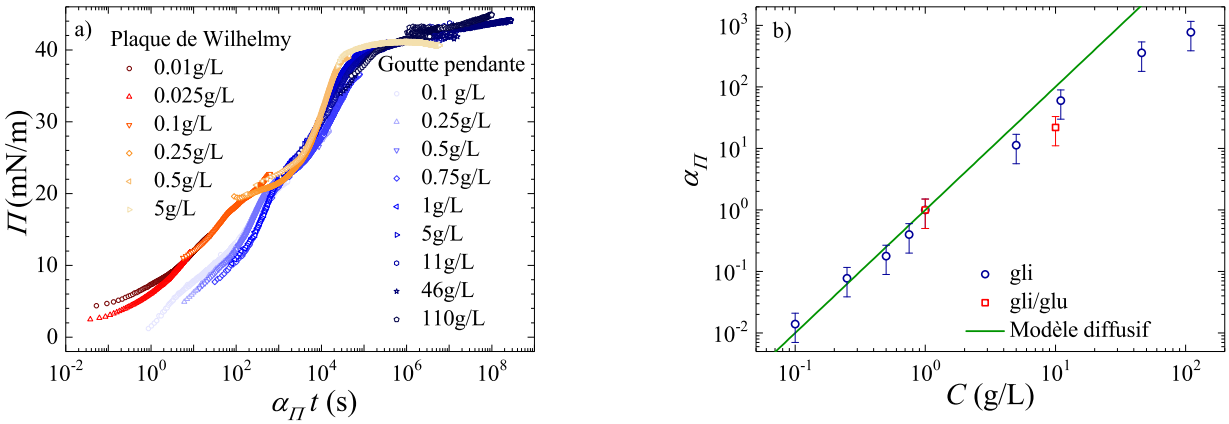


Fig. 4.2: a) Pression de surface en fonction du temps normalisé par le facteur d'échelle α_Π pour les mesures obtenues avec les géométries goutte (Bleu dégradé) et plan (rouge dégradé).
b) Facteur d'échelle α en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume C pour les mesures en goutte pendante (ronds vides bleus) et géométrie plan (ronds pleins rouges). Le trait plein correspond à un modèle diffusif sans paramètre libre (eq. 5.9).

4.3 Temps de latence

Les temps nécessaires pour mesuré une valeur non nulle de la pression de surface Π sont appelés les temps de latences. Ils ont été déterminés par des mesures provenant de la méthode de la goutte pendante et de la plaque de Wilhelmy (géométrie plan) comme le montre la figure 4.3 (a).

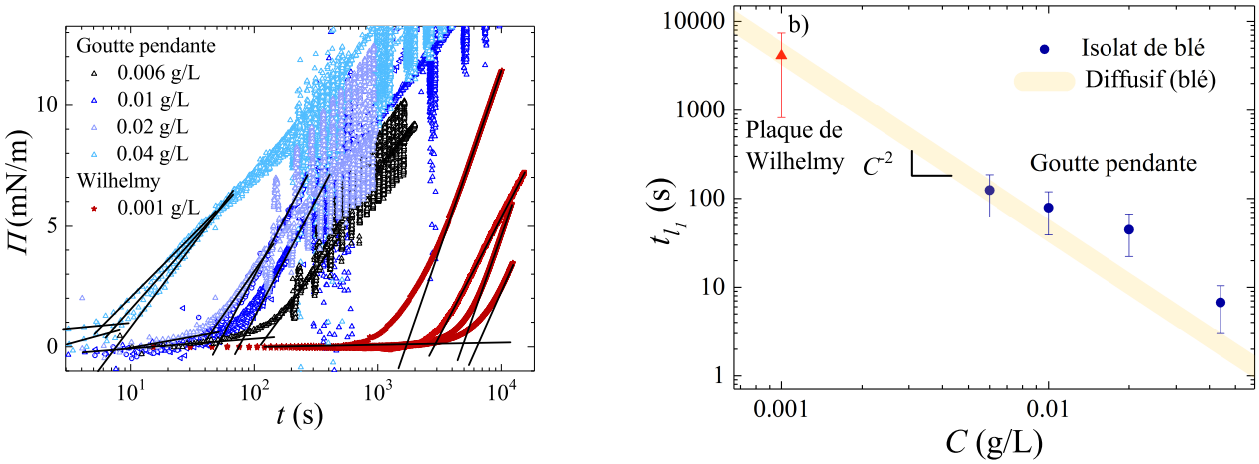


Fig. 4.3: a)Pression de surface en fonction du temps, mesuré par goutte pendante (triangles vides) et plaque de Wilhelmy (ronds pleins).
b) Temps de latence en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume. La bande représente le modèle diffusif (eq. 4.2).

Les temps de latence sont mesurés par la méthode des tangentes comme le montre la figure 4.3 (a). L'incertitude relative des temps de latence a été estimée à 50 % en moyennant les écarts entre la mesure de t_{l_1} à l'intersection des tangentes et le début de l'inflexion des courbes aux temps plus courts (fig. 4.3 (a)). Lorsque la répétition expérimentale donne une incertitude plus grande, elle ajoutée. La modélisation des temps de latence par le modèle diffusif s'écrit ainsi :

$$t_{l_1} = \frac{\pi}{D}\left(\frac{\Gamma_{l_1}}{2C}\right)^2 \tag{4.2}$$

Où t_{l_1} est le temps de latence, Γ_{l_1} la concentration superficielle d'excès latente, C la concentration des espèces en volume, D le coefficient de diffusion des espèces s'adsorbant à l'interface. Pour modéliser nos mesures on considère $D = D_{rapide}$ mesuré par diffusion dynamique de la lumière, C la concentration d'isolat protéique en solution et $\Gamma_{l_1} = 0.5$ mg/m^2 la concentration superficielle d'excès latente, donnée dans la publication (figure 6(a)) de ce chapitre. On remarque que la concentration superficielle d'excès latente pour la β-caséine est très proche ($\Gamma_{l_1} = 0.48$ mg/m^2 [189]) de celle obtenue pour les gliadines.
La figure 4.3 (b) représente les temps de latences obtenus par la méthode des tangentes (fig. 4.3(a)) en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume. Les mesures des temps de latence sont compatibles avec le modèle diffusif. Pourtant les gammes de concentration utilisées ne permettent

pas de construire les courbes maîtresse à cause de l'effet de déplétion. La déplétion augmente avec le temps et n'est donc visible qu'à temps suffisamment long . Aux temps de latence, dans l'intervalle de concentrations compris entre 0.001 g/L et 0.04 g/L, la déplétion du volume ne semble pas agir fortement sur les temps de latence puisqu'ils sont compatibles avec le modèle diffusif (4.3 (b)). En revanche, l'effet de déplétion agit à temps plus long, empêchant la construction de courbe maîtresse.

4.4 Mesures annexes

4.4.1 Rhéologie de cisaillement du film interfacial

Afin de compléter les mesures de rhéologie dilatationnelle et d'affirmer ou infirmer l'hypothèse d'un film gélifié, on utilise la géométrie bicône pour réaliser des mesures de rhéologie de cisaillement de l'interface comme illustré sur la figure 4.4 (a).

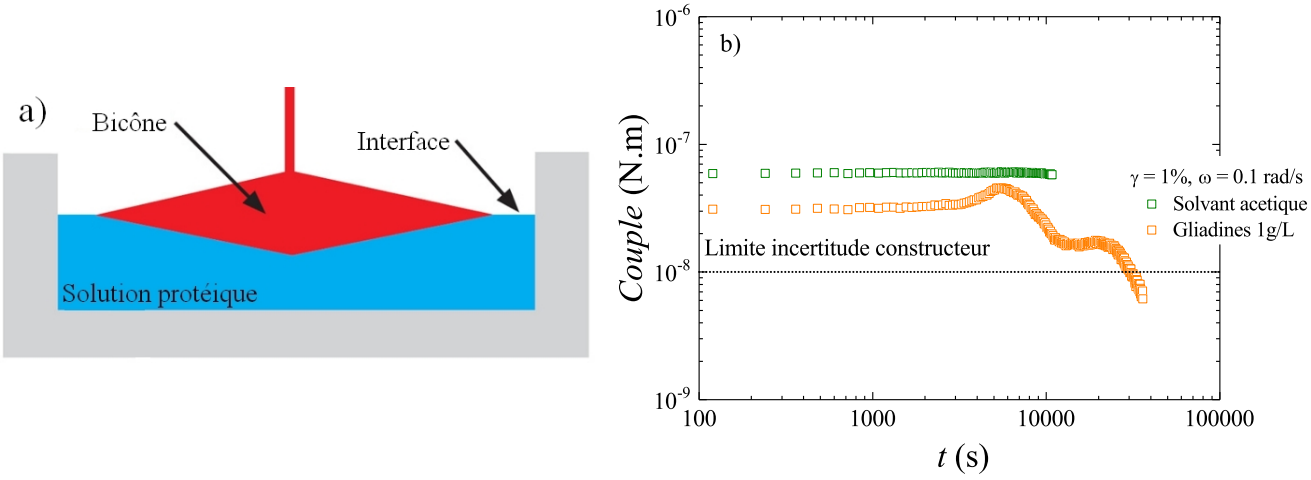


Fig. 4.4: a) Schéma du bicône à l'interface a/e.
b) Couple en fonction du temps à différentes amplitude et fréquence avec le solvant acétique et une solution de gliadines à 1 g/L.

La figure 4.4 (b) montre les couples en fonction du temps avec le solvant acétique et une solution de gliadines à 1 g/L. La limite de détection fournit par le constructeur est de 10^{-8} N.m (traits en pointillés). Cependant, les couples obtenus avec le solvant apparaissent supérieurs aux mesures obtenues avec la solution protéique. De plus le vieillissement du film n'a entraîné aucune augmentation qui semble mesurable. On peut donc supposer que la limite de détection n'est pas atteinte. Il n'est donc pas possible d'interpréter les résultats de G' et G'', dont le calcul donne des valeurs parfois négatives, pour évaluer la viscoélasticité du film protéique. On remarque que les modules élastiques et visqueux d'un film protéique formé avec de la β-caseine sont très faibles (G' et G'' compris entre 10^{-5}N/m et 10^{-4}N/m, obtenus avec la méthode de l'aiguille mgnétique [41**? ?**] et des valeurs de G' et G'' de l'ordre de grandeur 10^{-8}N/m obtenus par micro-rhéologie [**?**]). Etant donné la similarité de comportement des gliadines et des caséines, on peut facilement supposer que les modules de cisaillement des

gliadines sont également très faibles et devront être mesurés par une méthode plus sensible comme la méthode de l'aiguille magnétique.

4.4.2 Variation de composition gliadines/gluténines

Des mesures de pression de surface ont été effectuées avec un isolat protéique contenant une composition de masse équivalente de gliadines et de gluténines (isolat gli/glu) afin d'évaluer la contribution des gluténines dans l'isolat de gliadines (isolat gli) précédemment étudié.

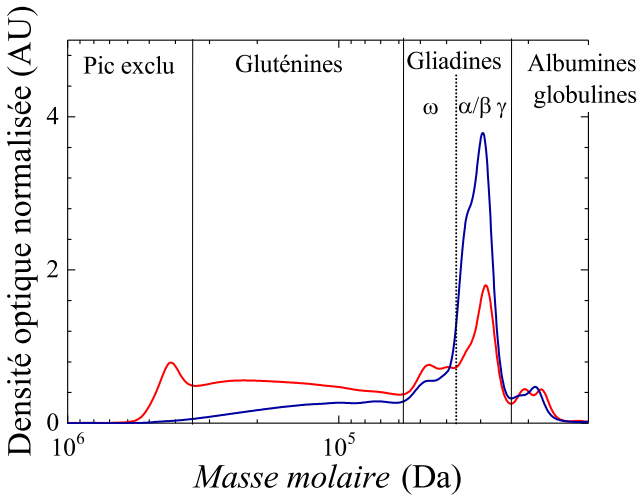


Fig. 4.5: Chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide à haute pression (HPLC) d'un isolat protéique contenant des fractions massiques de gliadines et de gluténines similaires.

La figure 4.5 montre les HPLC en fonction de la masse molaire. Le premier pic à 9 min correspond au pic exclu, il est associé aux espèces de masse molaire supérieures à 10^6 g/mol. La première bande large, entre 9.3 min et 13.2 min correspond aux globulines. Le pic entre 13.2 min et 14.5 min correspond aux gliadines ω, le pic entre 14.5 min et 16 min correspond aux gliadines α/β et γ, les deux derniers pics correspondent aux globulines et albumines de blé. Par rapport d'aires, on peut estimer la proportion de gliadines, de gluténines et de globulines et albumines dans les deux isolats. Le tableau montre ces proportions et rappelle celles de l'isolat de gliadines.

Tab. 4.1: Composition des isolats en fraction massique (% w/w)

Protéines	Isolat gli	Isolat gli/glu
Gluténines	9 %	45 %
Gliadines ω	13 %	16 %
Gliadines α/β et γ	71 %	29 %
Albumines et globulines	7 %	10 %

La figure 4.6 montre l'évolution temporelle de la pression de surface à l'interface a/e pour des solutions préparées avec le lot gli (symboles bleus) et le lot gli/glu (étoiles rouges) à différentes concentrations d'isolat en solution. La pression de surface augmente avec le temps pour les deux lots en

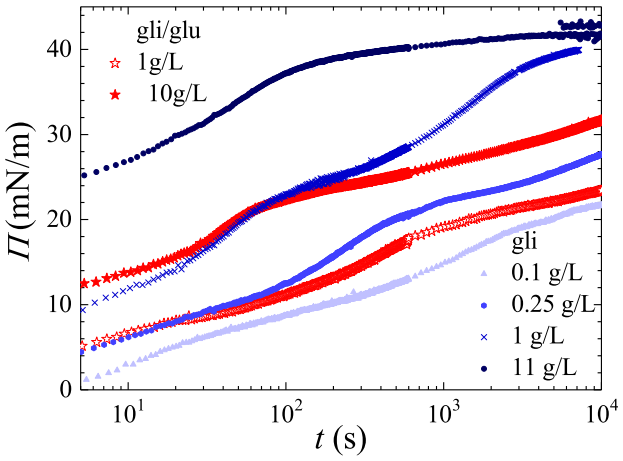


Fig. 4.6: Pression de surface en fonction du temps à l'interface a/e obtenue avec les isolats gli (symboles bleus dégradés) et gli/glu (étoiles rouges) à différentes concentrations d'isolat protéique en solution.

suivant une forme similaire, décalée en temps. Le lot mixte est moins tensio-actif que le lot gli et suggère que les glu ne sont pas ou peu tensio-actives. Cela est compatible avec la structure primaire des gluténines, plus riche en acides aminés hydrophiles.
Le lot gli/glu contient 45 % de gliadines, une solution à 10 g/L de ce lot contient donc 4.5 g/L de gliadines, pourtant, l'évolution temporelle de Π est similaire à une courbe obtenue avec une solution à 1 g/L du lot gli, soit 0.84 g/L de gliadines. On peut donc supposer que l'augmentation de la proportion de gluténines diminue l'aptitude tensioactive des gliadines.

Une courbe maîtresse peut être créée par décalage des courbes en temps pour les deux interfaces sur un principe de superposition temps/concentration. La translation en temps sur un graphique tracé en échelle logarithmique équivaut à multiplier le temps de la courbe par un facteur d'échelle α_Π, permettant la juxtaposition des courbes. On choisit arbitrairement la courbe de référence à 1 g/L afin de pouvoir comparer les courbes maîtresses obtenues avec les deux lots.
La courbe maîtresse (fig. 5.11) est construite par le recouvrement de la courbe de référence (ici la mesure à 1g/L pour les deux interfaces) avec les courbes obtenues à d'autres concentrations de manière à maximiser la juxtaposition (en échelle logarithmique les points aux temps courts ont donc plus de poids que les points aux temps plus longs). La figure 4.7 (a) montre les courbes maîtresses de pressions de surface en fonction du temps normalisé par $\alpha_\Pi t$, pour les deux lots. L'allure de la pression de surface Π avec le temps est la même pour les deux isolats, cela suggère que ce sont les mêmes espèces adsorbées à l'interface. Cependant la courbe obtenue avec le lot gli/glu apparaît décalée, elle se superpose à la courbe maîtresse obtenue pour le lot gli avec un facteur $\frac{1}{18}$. Cela indique que le lot gli/glu est moins tensioactif que le lot gli et supporte l'hypothèse d'interactions entre gliadines et gluténines conduisant à des assemblages pas ou peu tensio-actifs dans le lot mixte. Le recouvrement des courbes maîtresses est valable jusqu'à $\Pi = 20$ mN/m. Des mesures complémentaires seraient nécessaires avec le lot gli/glu pour identifier clairement le comportement à temps $\alpha_\Pi t$ plus long.

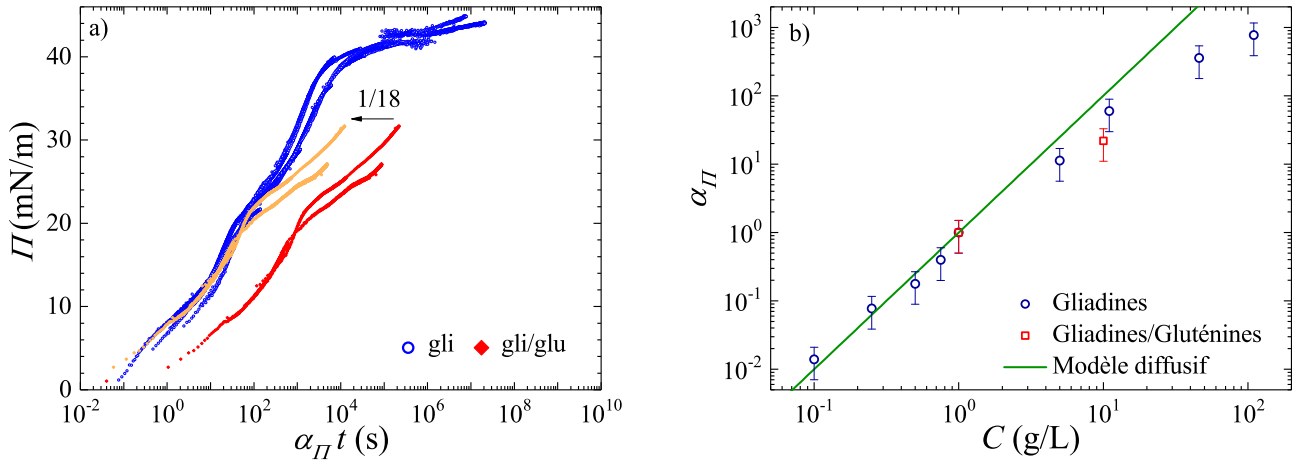


Fig. 4.7: a) Pression de surface en fonction du temps normalisé par le facteur d'échelle α_Π pour les mesures obtenues avec les lots gli (Bleu) et gli/glu (rouge). Courbe gli/glu décalée d'un facteur $\frac{1}{18}$ (orange) b) Facteur d'échelle α_Π en fonction de la concentration C. Le trait plein correspond à un modèle diffusif sans paramètre libre (eq. 5.9).

La figure 4.7 (b) montre les facteurs d'échelles en fonction de la concentration en isolat C. La concentration de référence est de 1 g/L. Les facteurs d'échelles permettant d'obtenir la courbe maîtresse de pression avec le facteur d'échelle du lot gli/glu à 10 g/L est dans l'ordre de grandeur de ce qui a été obtenu pour le lot gli.

5. ISOLAT PROTÉIQUE DE TOURNESOL AUX INTERFACES AIR/EAU ET HUILE/EAU

Dans ce chapitre, nous étudions la cinétique de formation et la structure d'un film protéique formé aux interfaces air/eau (a/e) et hexadécane/eau (h/e) d'une solution d'isolat de tournesol en combinant les mesures de pression de surface, de viscoélasticité interfaciale, de profil optique de l'interface et des mesures de l'évolution de la turbidité de gouttes pendantes. Les solutions sont préparées dans l'hydroxyde de sodium à pH 10 car la solubililité de l'isolat est maximale dans ce solvant et le pH est maintenu constant par l'isolat. Les concentrations d'isolat protéique vont de de 0.01 g/L à 100 g/L.

5.1 Mesures expérimentales et premières analyses

5.1.1 Pression de surface en fonction du temps

La pression de surface est mesurée au cours du temps par la méthode de goutte pendante : une goutte de solution protéique pend au bout d'un capillaire, dans l'air ou l'hexadécane. Le temps t est le temps écoulé depuis la formation de la goutte. La mesure est effectuée pour un âge du film interfacial allant de 5 à 3600 s aux interfaces air/eau (a/e) et hexadécane/eau (h/e). La figure 5.1 montre les pressions de surface, $\Pi_{a/e}$, à l'interface a/e (a) et $\Pi_{h/e}$, à l'interface h/e (b) en fonction du temps t, pour des concentrations C d'isolat protéique en solution, allant de 0.02 g/L à 10 g/L (a) et de 0.01

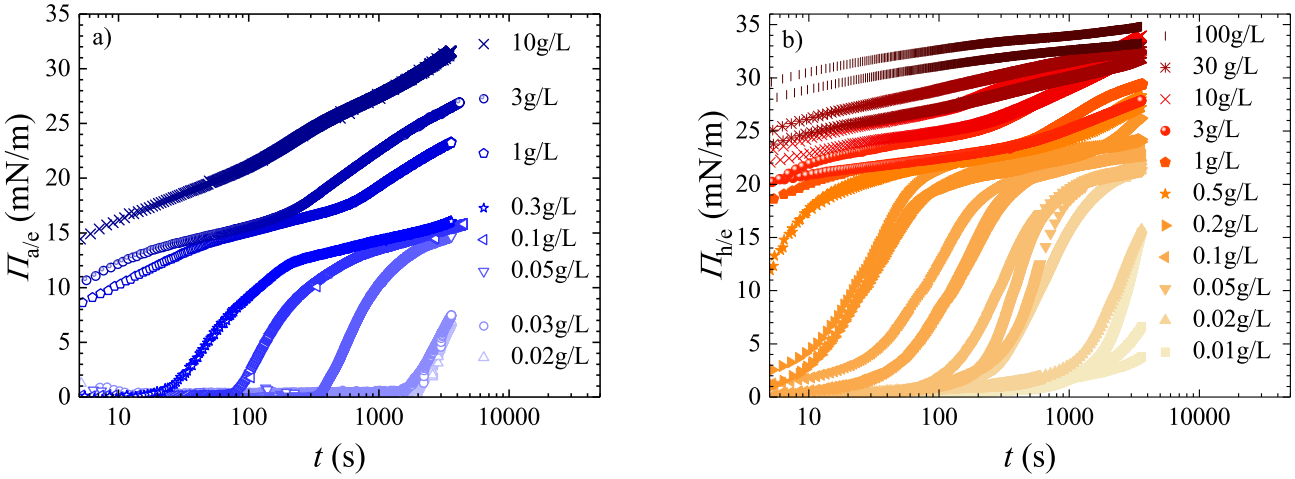


Fig. 5.1: Pression de surface en fonction du temps à différentes concentrations d'isolat protéique en volume, aux interfaces a/e (a) et h/e (b).

g/L 100 g/L (b). Les incertitudes sur la pression de surface, $\Delta\Pi = 2$ mN/m, sont déterminées par la répétition des mesures.

Des comportements similaires sont observés pour les deux types d'interface. Quand $C \leq 0.3$ g/L à l'interface a/e, et $C \leq 0.1$ g/L à l'interface h/e, la pression de surface est nulle aux temps courts, puis augmente après un temps appelé temps de latence t_{l_1}. Lorsque la concentration est comprise entre 0.05 et 3 g/L à l'interface a/e et entre 0.02 et 0.5 g/L à l'interface h/e, Π atteint un pseudo-plateau pendant lequel la pression de surface n'augmente que très faiblement avec le temps. Après ce pseudo-plateau, pour C compris entre 1 et 10 g/L à l'interface a/e et C compris entre 0.2 et 100 g/L à l'interface h/e, on observe une nouvelle phase d'augmentation de Π en fonction du temps, sans toutefois atteindre d'équilibre, dans la limite du temps de mesure (1 h).

Le premier temps de latence t_{l_1} correspond au temps nécessaire pour que les protéines atteignent une concentration superficielle d'excès latente faisant augmenter la pression de surface au delà des incertitudes de mesures [24]. Le temps de latence est mesuré par la méthode des tangentes comme le montre la figure 5.2. La tangente $\Delta\Pi$ pour $t \to 0$ est tracée ainsi que la tangente $\Delta\Pi$ lorsque la pente est significativement supérieure à 1. L'intersection entre les tangentes correspond au temps de latence. L'incertitude relative des temps de latence a été estimée à 50 % à l'interface a/e et 60 %. Lorsque la répétition expérimentale donne une incertitude plus grande, elle est ajoutée (fig. 5.2). A l'interface h/e, une faible augmentation de pression de surface est visible à temps court et la transition vers l'augmentation de pression de surface est moins abrupte que pour l'interface a/e. La figure 5.3 montre l'évolution des temps de latence t_{l_1} avec la concentration d'isolat protéique en solution, aux interfaces h/e et a/e. Pour une même concentration en volume, le temps de latence est toujours plus grand à l'interface a/e qu'à l'interface h/e. De plus, on mesure que le temps de latence diminue avec la concentration en suivant une loi de puissance C^{-p} où $p = 1.8 \pm 0.2$ à l'interface a/e et $p = 1.6 \pm 0.6$ à l'interface h/e.

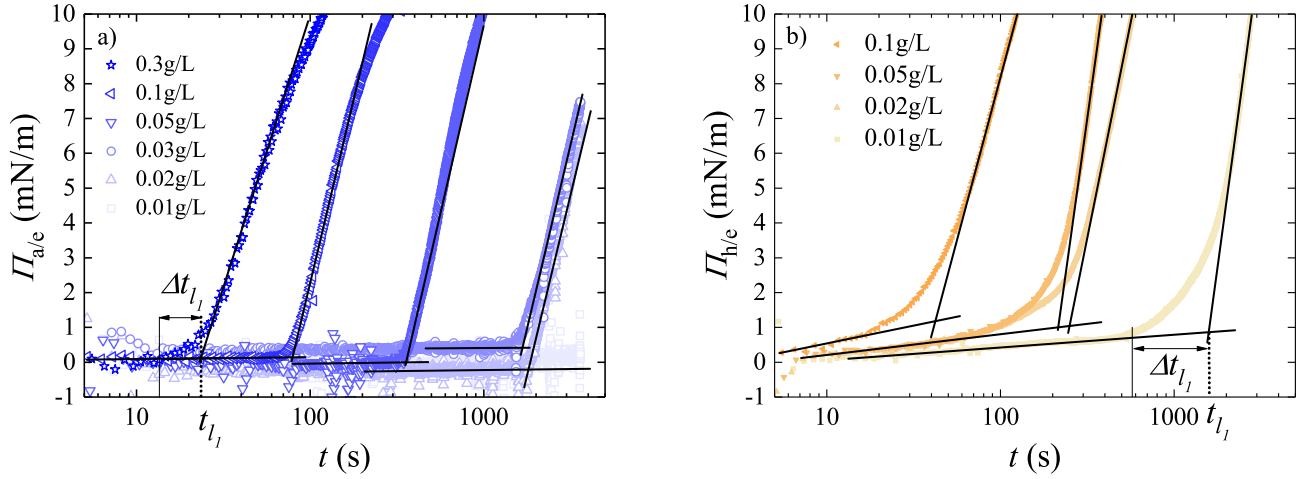


Fig. 5.2: Pression de surface en fonction du temps aux interfaces a/e (a) et h/e (b). L'intersection des tangentes est utilisée pour déterminer le temps de latence t_{l_1}.

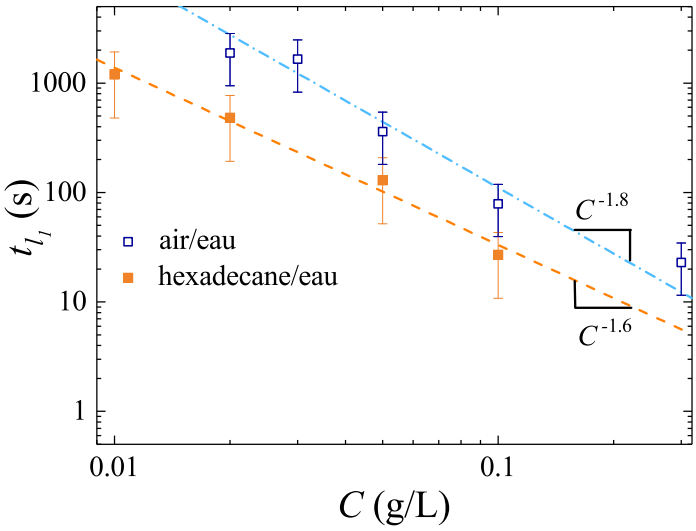


Fig. 5.3: Temps de latence t_{l_1} en fonction de la concentration, aux interfaces air/eau (carrés vides bleus) et hexadécane/eau (carrés pleins orangés). Les lignes correspondent aux meilleurs ajustement par une loi de puissance.

On définit également les temps de latence $t_{l_{2,min}}$ et $t_{l_{2,max}}$ comme correspondant aux temps d'entrée et de sortie des pseudo-plateaux en pression de surface. Ces temps de latence sont obtenus par la méthode des tangentes comme le montre la figure 5.4. Les incertitudes sur les temps de latence sont obtenues par les variations possibles lors du tracé des tangentes dont l'incertitude relative est évaluée à 50 % à l'interface a/e et 60 % à l'interface h/e. La figure 5.5 (a) montre les temps de latence à l'entrée $t_{l_{2,min}}$ et à la sortie $t_{l_{2,max}}$ des pseudo-plateaux, mesurés en fonction de la concentration en volume, aux interfaces a/e (symboles vides) et h/e (symboles pleins). Les temps de latences d'entrée $t_{l_{2,min}}$ et de sortie $t_{l2,max}$ sont du même ordre de grandeur pour les deux types d'interface étudiés bien

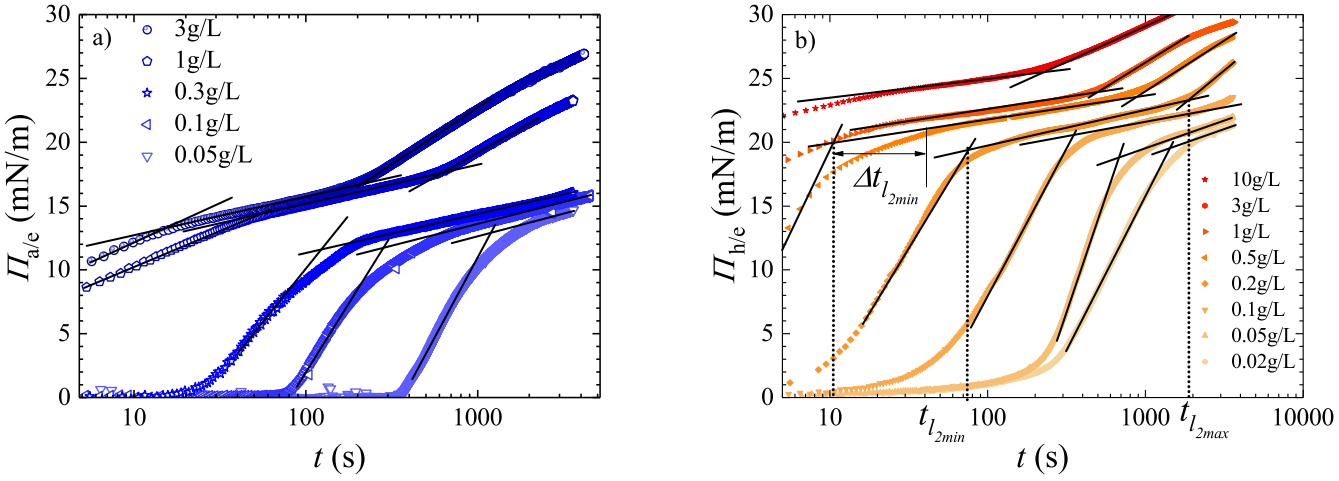


Fig. 5.4: Pression de surface en fonction du temps, aux interfaces a/e (a) et h/e (b). Les temps de latence sont obtenus par l'intersection des tangentes.

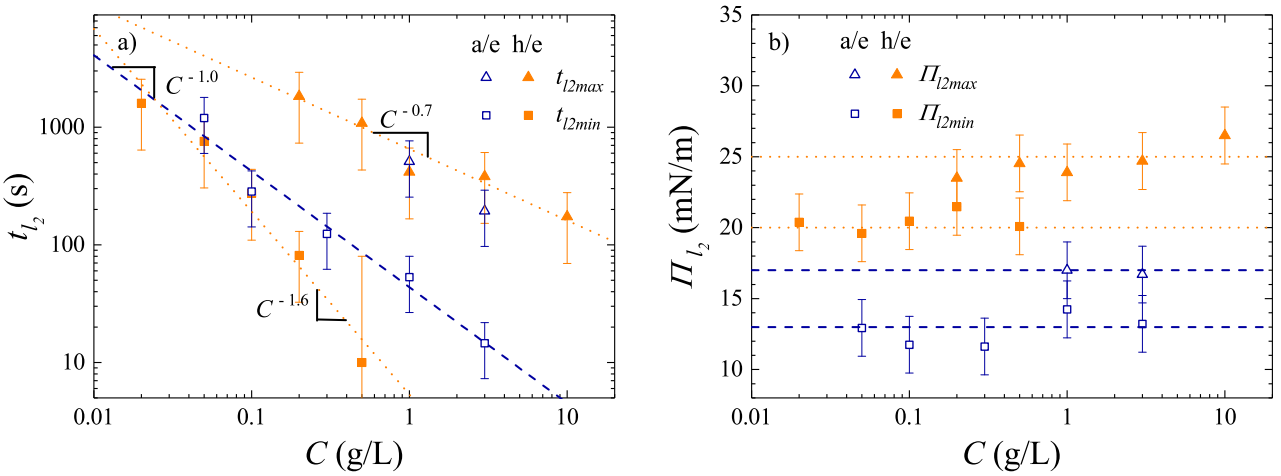


Fig. 5.5: a) Temps de latence au début et à la fin des pseudo-plateaux en fonction de la concentration. Les lignes correspondent aux ajustements par des lois de puissance.
b) Pression de surface à l'entrée et la sortie des pseudo-plateaux en fonction de la concentration. Les lignes horizontales correspondent aux valeurs moyennées aux différentes concentrations.

que le temps de latence d'entrée soit légèrement plus court à l'interface h/e qu'à l'interface a/e. On observe que $t_{l_{2,min}}$ et $t_{l_{2,max}}$ décroissent avec la concentration pour les deux interfaces en suivant les lois de puissance en C^{-p} où $p = 1.0 \pm 0.2$ à l'entrée des pseudo-plateaux à l'interface a/e, $p = 1.6 \pm 0.4$ à l'interface h/e ; et $p = 0.7 \pm 0.3$ à la sortie des pseudo-plateaux à l'interface h/e, les deux points à l'interface a/e sont compatibles avec la loi de puissance en C^{-p} avec $p = 0.7 \pm 0.3$. Les incertitudes sur les lois de puissance sont déterminées par les exposants minimum et maximum des ajustements passant par les barres d'incertitude des points de mesures. La figure 5.5 (b) montre la pression de surface à l'entrée $\Pi_{l_{2,min}}$ et à la sortie $\Pi_{l_{2,max}}$ des pseudo-plateaux en fonction de la concentration en volume. Les pressions de surface correspondant aux pseudo-plateaux apparaissent peu dépendantes de la concentration et ont pour valeur moyenne $\Pi_{l_{2,a/e}} = 15 \pm 2$ mN/m à l'interface a/e et $\Pi_{l_{2,h/e}} = 22 \pm 3$ mN/m à l'interface h/e.

5.1.2 Profil optique

Pour étudier l'évolution du profil optique aux interfaces a/e et h/e en présence de protéines, on commence par détecter l'écart $\Delta\theta_B$ entre l'angle de Brewster $\theta_{B,C}$ obtenu avec une solution protéique de concentration C et avec le solvant pur $\theta_{B,0}$: $\Delta\theta_B = \theta_{B,C} - \theta_{B,0}$. La figure 5.6 montre la variation de $\Delta\theta_B$ 1 h après la formation du film protéique, en fonction de la concentration d'isolat protéique en volume. L'incertitude sur l'angle de Brewster est de 0.05°, elle est obtenue par la répétition des mesures. L'angle de Brewster ne varie pas au delà des incertitudes dans la gamme de concentrations $C \leq 10$ g/L. Lorsque le film est optiquement trop fin pour faire varier l'angle de Brewster au delà de 0.1° la théorie des perturbations est appropriée et permet de déduire le paramètre de déviation optique I_1.
La figure 5.7 montre le paramètre de déviation I_1 mesuré en fonction du temps aux interfaces a/e (a)

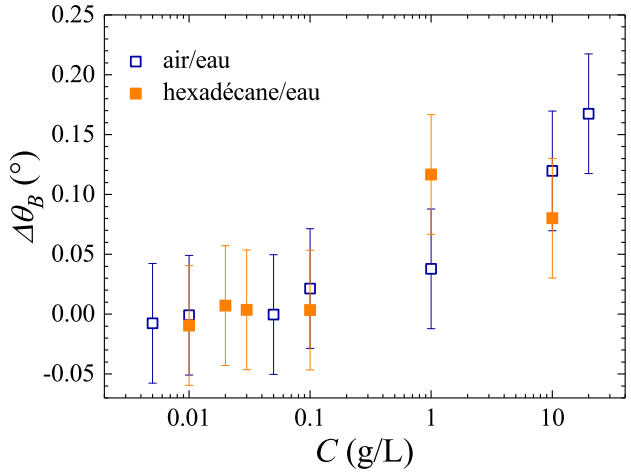


Fig. 5.6: Variation de l'angle de Brewster $\Delta\theta_B$ par rapport à celui obtenu avec le solvant $\theta_{B,0}$ en fonction de la concentration en isolat protéique en volume pour un film âgé de 1 h aux interfaces air/eau (symboles vides bleus) et hexadécane/eau (symboles pleins orangés).

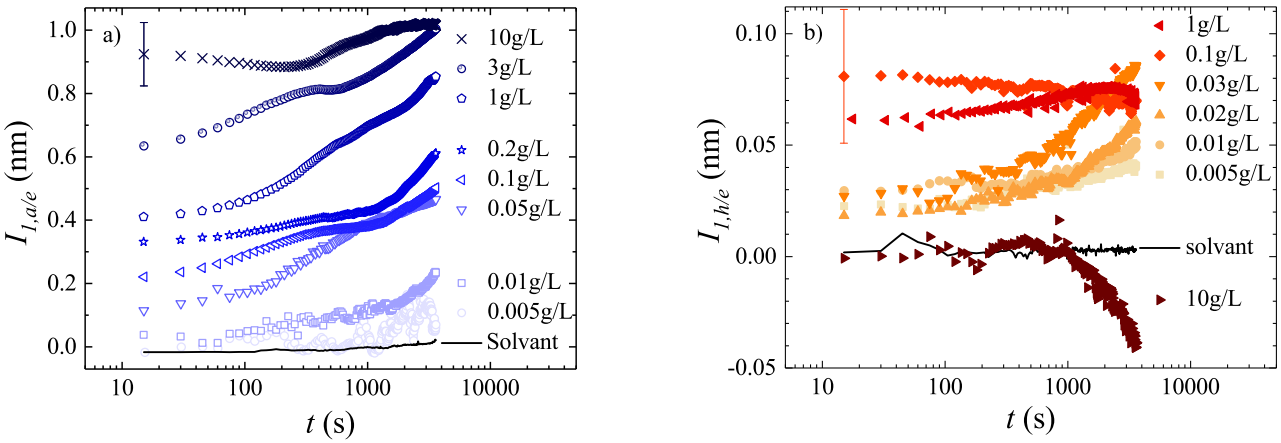


Fig. 5.7: Paramètre de déviation $I_{1,a/e}$ et $I_{1,h/e}$ aux interfaces a/e (a) et h/e (b) en fonction du temps pour les concentrations protéiques indiquées dans les légendes. L'incertitude de mesure est représentée sur le premier point de la plus haute concentration.

et h/e (b). Les incertitudes sont obtenues par la répétition des mesures effectuées avec le solvant et les solutions protéiques : $\Delta I_{1,a/e} = \pm 0.1$ nm et $\Delta I_{1,h/e} = \pm 0.03$ nm aux interfaces a/e et h/e, respectivement.

A l'interface a/e le paramètre de déviation $I_{1,a/e}$ est positif. Il croît avec le temps, pour toutes les concentrations d'isolat protéique en solution étudiées (C de 0.005 à 10 g/L) et est d'autant plus élevé que C est grande.

A l'interface h/e, le paramètre de déviation $I_{1,h/e}$ est non monotone. Il est positif et augmente pour des concentrations $C \leq 0.03$ g/L et est constant dans la limite du temps de mesure pour $C = 0.1$ et 1 g/L . Pour $C = 10$ g/L, on mesure que $I_{1,h/e}$ est comparable aux mesures effectuées avec le solvant

aux temps courts ($I_{1,h/e} = 0$ nm) et devient négatif et décroissant à partir de 1000 s.
La non monotonie et le changement de signe de $I_{1,h/e}$ (fig. 5.7) traduisent les variations de l'indice de réfraction interfacial n_L autour de l'indice de réfraction de l'hexadécane n_h. Lorsque $I_{1,h/e}$ est positif $n_L > n_h$ et inversement lorsque $I_{1,h/e}$ est négatif $n_L < n_h$.

A l'interface a/e ou h/e le paramètre de déviation s'écrit analytiquement de la façon suivante :

$$I_{1,0/e} = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{(n_L^2(z) - n_0^2)(n_L^2(z) - n_e^2)}{n_L^2(z)} \mathrm{d}z \tag{5.1}$$

Où $n_L(z)$ est l'indice de réfraction du film interfacial en fonction de la hauteur z, $z = 0$ à l'interface, $z > 0$ dans le milieu 0 (dans notre cas, l'air ou l'hexadécane) et $z < 0$ dans l'eau. n_e est l'indice de réfraction de la solution protéique. Dans notre cas, $n_e = 1.333$ pour les concentrations $C < 10$ g/L et $n_e = 1.334$ pour $C = 10$ g/L.

A l'interface a/e, en supposant que le film est principalement dans l'eau, l'indice de réfraction du film interfacial n_L est $n_e < n_L < n_p$ où $n_p = 1.503$ est l'indice de réfraction de l'isolat protéique. L'indice de réfraction de l'air $n_a = 1$ et celui de la solution $n_e = 1.333$. Avec ces paramètres, on peut faire l'approximation $\frac{(n_L^2(z)-n_a^2)}{n_L^2(z)} \approx \frac{(n_e^2-n_a^2)}{n_e^2}$. Cette approximation est nécessaire à la modélisation de la concentration superficielle d'excès à partir du paramètre de déviation $I_{1,a/e}$ (section 2.1.4.2).
A l'interface h/e, en supposant que le film est principalement dans la solution protéique $n_e < n_L < n_p$. L'indice de réfraction de l'hexadécane est $n_h = 1.432$. Avec ces paramètres, l'approximation $\frac{(n_L^2(z)-n_h^2)}{n_L^2(z)} \approx \frac{(n_e^2-n_h^2)}{n_e^2}$ n'est pas valide. Par conséquent il n'est pas possible de modéliser la concentration superficielle d'excès à partir du paramètre de déviation $I_{1,h/e}$ (section 2.1.4.2).

Pour illustrer les profils optique aux interfaces a/e et h/e, on définit le contraste optique entre le film interfacial et la solution protéique $\Delta n_{L/e} = n_L - n_e$, où n_L est l'indice de réfraction du film, n_e est l'indice de réfraction de l'eau. On définit le contraste optique entre le film interfacial et l'air $\Delta n_{L/a} = n_L - n_a$ et l'hexadécane $\Delta n_{L/h} = n_L - n_h$.
La figure 5.8 montre la hauteur z en fonction de l'indice de réfraction, au voisinage de l'interface correspondant à $z = 0$. Les traits pleins correspondent au profil de l'indice de réfraction pour une interface vierge. Les traits en pointillés montrent le profil optique en présence d'un film protéique complètement dans l'eau. Le profil optique du film protéique est tracé avec une valeur de l'indice de réfraction interfacial n_L constante et une épaisseur arbitraire. n_L peut varier entre l'indice de réfraction de la solution ($n_e = 1.333$) et l'indice de réfraction de l'isolat protéique ($n_p = 1.503$). Les fractions protéiques dans le film interfacial sont modélisées par l'indice de réfraction interfacial (eq. 5.13). On choisie les fractions protéiques de 30 % et 70% de manière à montrer que I_1 change de signe pour l'interface h/e uniquement, lorsque le film est supposé uniquement dans l'eau. Les contrastes optiques du film avec chacune des phases sont symbolisés par des doubles flèches. A l'interface a/e

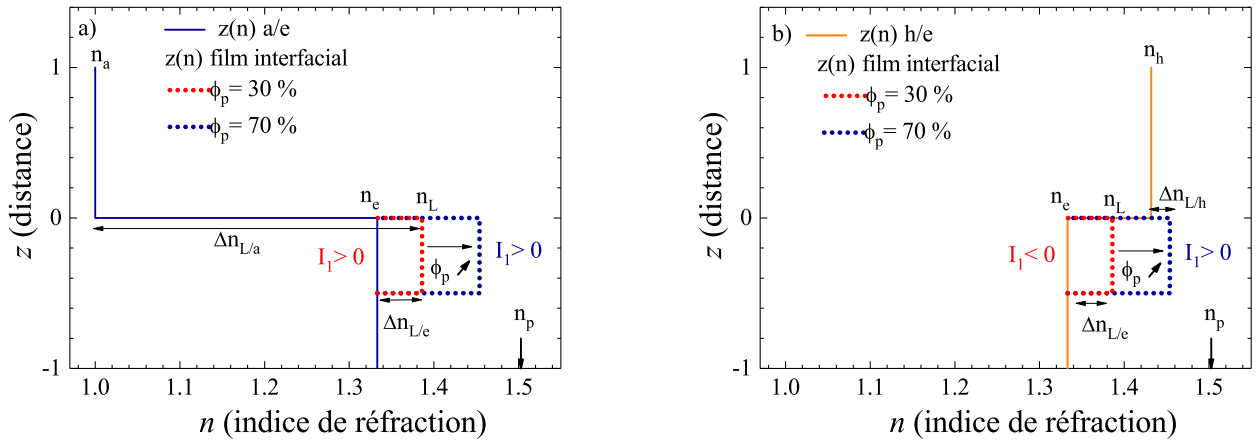


Fig. 5.8: Schéma du profil optique d'un film protéique intégralement dans l'eau aux interfaces a/e (a) et h/e (b). $\Delta n_{L/e}$ est le contraste optique du film avec la solution protéique, $\Delta n_{L/a}$ et $\Delta n_{L/h}$ sont respectivement les contrastes optiques du film avec l'air et l'hexadécane.

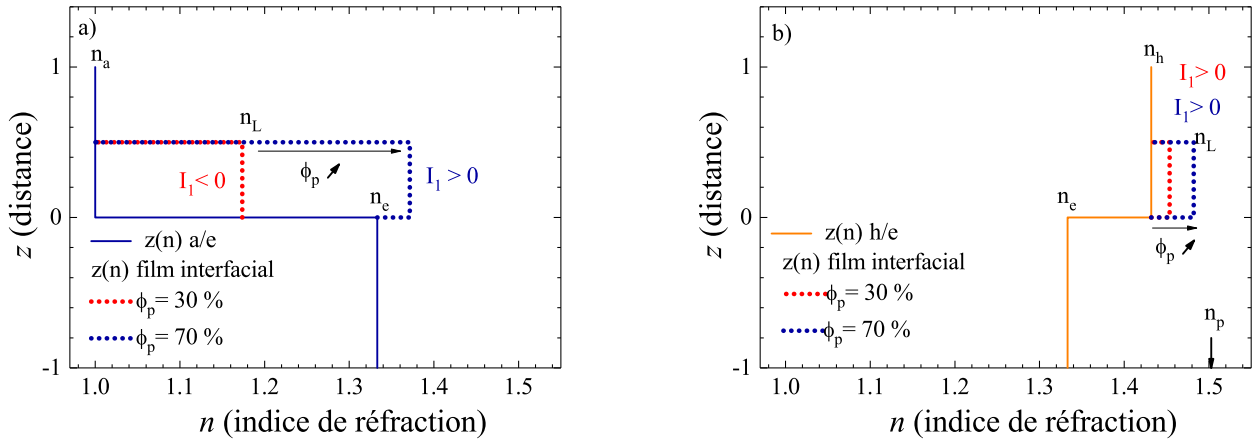


Fig. 5.9: Schéma du profil optique d'un film protéique intégralement dans l'air à l'interface a/e (a) et intégralement dans l'huile à l'interface h/e (b).

(fig. 5.8(a)), le contraste optique entre le film et l'air est dans tous les cas plus grands que le contraste entre le film et l'eau.

A l'interface h/e, les mesures expérimentales de $I_{1,h/e}$ sont positives dans les premiers moments de formation du film interfacial (fig. 5.7). Par conséquent, $n_h < n_L < n_p$ comme c'est le cas sur la figure 5.8 (b) pour une fraction protéique à 70 %. Cependant, une fraction protéique aussi grande dans les premiers moment de l'adsorption n'est pas possible. $I_{1,h/e}$ positif indique donc que le film à l'interface h/e est avec une fraction non négligeable dans l'huile. La figure 5.9 montre les profils optiques des films protéiques à 30 % et 70 % en considérant tout le film dans l'air (fig. 5.9 (a)) et dans l'eau (fig. 5.9 (b)). Dans ce cas $I_{h,e}$ est positif quelque soit la fraction protéique adsorbée. Au contraire à l'interface a/e, lorsque la fraction protéique n'est pas suffisante pour donner un indice de réfraction moyen supérieur à celui de la solution, $I_{a,e}$ est négatif.

En faisant l'approximation $\frac{(n_L^2(z)-n_a^2)}{n_L^2(z)} \approx \frac{(n_e^2-n_a^2)}{n_e^2}$, possible uniquement à l'interface a/e, en considérant le film principalement dans l'eau, le paramètre de déviation peut alors s'écrire :

$$I_{1,a/e} \approx \frac{n_e^2 - n_a^2}{n_e^2} \int_{-\infty}^{+\infty} (n_L^2(z) - n_e^2) \mathrm{d}z \tag{5.2}$$

$$\Gamma \approx \frac{n_e^2}{n_e^2 - n_a^2} I_{1,a/e} \left(\frac{\partial n_e^2}{\partial \phi_p} \right)^{-1} \tag{5.3}$$

Où $I_{1,a/e}$ est le paramètre de déviation de l'interface d'une solution protéique par rapport à l'interface vierge, n_e est l'indice de réfraction de la solution à la fraction volumique en protéines ϕ_p.

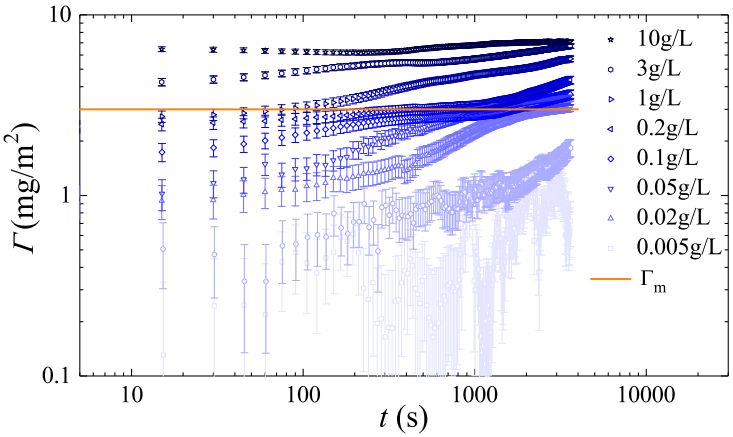


Fig. 5.10: Concentration superficielle d'excès en fonction du temps pour différentes concentrations protéiques en solution, à l'interface a/e. Le trait plein correspond à la valeur $\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2.

La figure 5.10 montre la concentration superficielle d'excès Γ en fonction du temps à l'interface a/e. L'incertitude sur Γ vient de la propagation de l'incertitude sur $I_{1,a/e}$. La concentration superficielle d'excès Γ croît en fonction du temps de façon monotone pour toutes les concentrations en protéines et Γ est, en général, d'autant plus grand que C augmente. Néanmoins la forme des courbes en fonction du temps varie selon la concentration. Les mesures effectuées avec les concentrations comprises entre C =0.02 et 0.2 g/L se rejoignent vers un plateau à la valeur $\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2. Γ croît au delà du pseudo-plateau. La plus haute concentration superficielle d'excès ($\Gamma = 7.0$ mg/m^2) est mesurée après 1 h avec la plus haute concentration d'isolat protéique en volume ($C = 10$ g/L).

5.1.3 Construction de courbes maîtresses

L'observation de la similitude dans les formes des courbes temporelles de pression de surface, mesurées pour différentes concentrations d'isolat protéique en volume, a conduit à la construction de courbes maîtresses. Celles-ci sont construites par décalage des courbes en temps pour les deux interfaces sur un principe de superposition temps/concentration. La translation en temps sur un graphique tracé en échelle logarithmique équivaut à multiplier le temps de la courbe par un facteur d'échelle

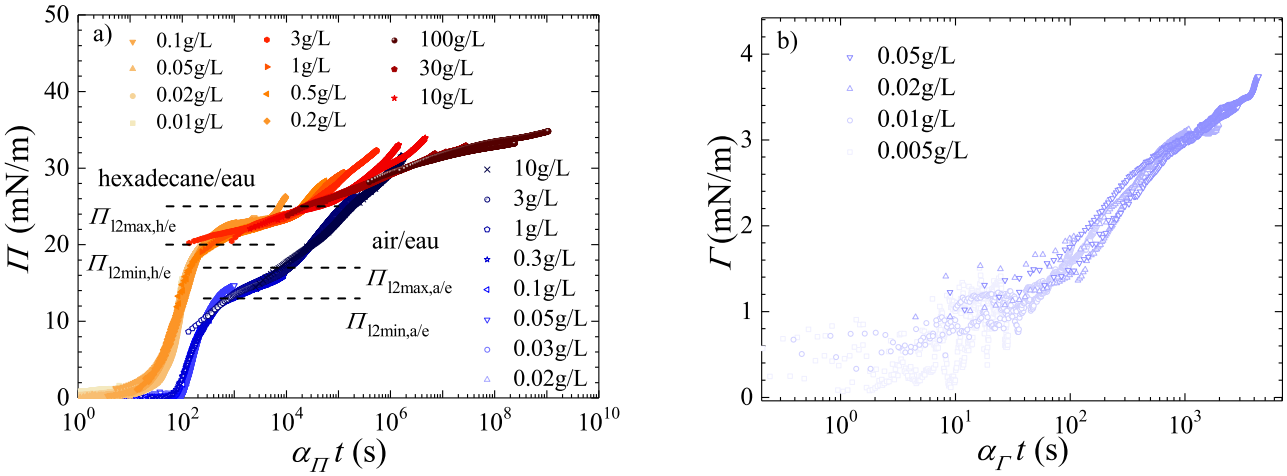


Fig. 5.11: a) Pression de surface de la figure 5.1 en fonction du temps normalisé par α_Π aux interfaces hexadécane/eau (symboles pleins orangés) et air/eau (symboles vides bleues).
b) Concentration superficielle d'excès de la figure 5.10 en fonction de α_Γ à l'interface a/e.

α_Π, permettant la juxtaposition des courbes. La courbe de référence est choisie de manière à contenir le premier temps de latence à t_{l_1} et l'entrée aux pseudo-plateaux à $t_{l_{2,min}}$. Les courbes maîtresses (fig. 5.11) sont construites par le recouvrement des courbes de référence (ici les mesures à 0.1 g/L pour les deux interfaces) avec les courbes obtenues à d'autres concentrations de manière à maximiser la juxtaposition (en échelle logarithmique les points aux temps courts ont donc plus de poids que les points aux temps plus longs).

La figure 5.11 (a) montre les courbes maîtresses obtenues pour la pression de surface en fonction du temps normalisé par $\alpha_\Pi t$, pour les deux interfaces. Les courbes forment une courbe maîtresse avec un très bon recouvrement jusqu'aux pseudo-plateaux (à $\Pi_{l_2} = 15 \pm 2$ mN/m à l'interface a/e et $\Pi_{l_2} = 22 \pm 3$ mN/m à l'interface h/e). Π croît au delà des pseudo-plateaux après un temps normalisé croissant avec la concentration sans atteindre de valeur stationnaire dans la limite du temps de mesure (1h).

La figure 5.11 (b) montre l'ajustement de la concentration superficielle d'excès en fonction du temps normalisé, à l'interface a/e pour des concentrations comprises entre 0.005 g/L et 0.2 g/L. Les courbes forment une courbe maîtresse et croissent continument avec le temps jusqu'à $\Gamma = 3.0 \pm 0.2$ mg/m^2. Pour des concentrations en volume plus élevées, les courbes des concentrations superficielles d'excès au cours du temps (fig. 5.10) ne peuvent pas se superposer.

La construction des courbes maîtresses nécessite d'utiliser un facteur d'échelle différent pour chaque concentration comme le montre la figure 5.12. Les ronds et étoiles vides correspondent respectivement aux valeurs utilisées pour Π et Γ à l'interface a/e, les ronds pleins correspondent aux valeurs utilisées pour Π à l'interface h/e. Les incertitudes sont obtenues expérimentalement par la répétition des mesures en prenant les valeurs maximum et minimum du facteur d'échelle pour chaque concentration et par l'intervalle de décalage possible des courbes pour construire les courbes maîtresses. Les facteurs d'échelles utilisés pour la construction d'une courbe maîtresse des données de concentration

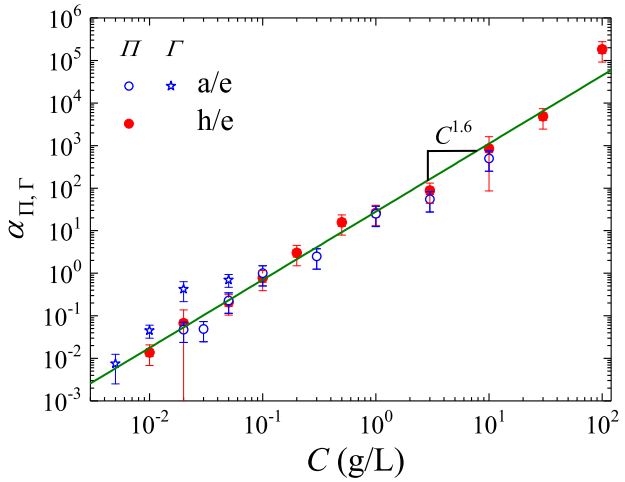


Fig. 5.12: Facteur d'échelle α_Π et α_Γ en fonction de la concentration d'isolat protéique en solution. Le trait plein correspond au meilleur ajustement de tous les points par une loi de puissance.

superficielle d'excès et de pression de surface concordent. De plus, on peut également observer des facteurs d'échelle similaires entre les interfaces a/e et h/e. Le facteur d'échelle croît avec la concentration d'isolat protéique en solution en suivant une loi de puissance C^p pour les deux types d'interfaces où $p = 1.6 \pm 0.2$.

Pour sonder la contribution de l'adsorption protéique dans l'évolution temporelle de la courbe maîtresse de pression de surface, un lavage de la goutte est effectué par un double capillaire coaxial. Cela permet de réduire la concentration protéique dans le volume d'une goutte plongée dans l'hexadécane, sans détruire la surface de cette goutte (protocole 2.18). La figure 5.13 montre l'évolution de pression de surface en fonction du temps normalisé pour quatre lavages et la courbe maîtresse

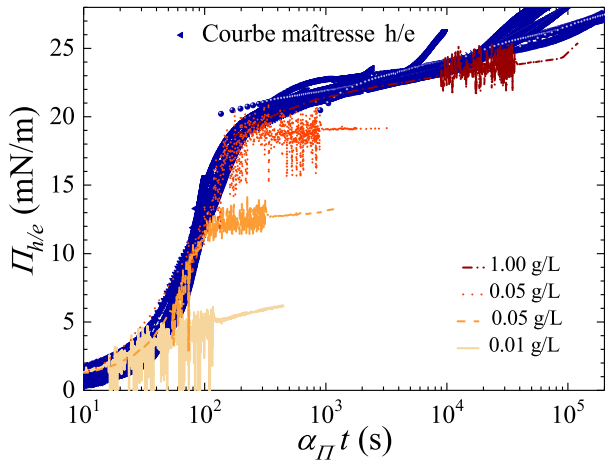


Fig. 5.13: Pression de surface en fonction du temps normalisé par α_Π sans lavage (bleu foncé en arrière plan) et avec procédure de lavage (au premier plan).

obtenue précédemment (traits bleues, fig. 5.11), à l'interface hexadécane/eau. Le lavage correspond au moment où la pression de surface Π est fortement bruitée. La courbe maîtresse en bleu foncé permet de comparer l'évolution temporelle de Π avec et sans lavage par rapport aux mesures sans lavage. Les courbes avec lavage sont décalées en temps pour se juxtaposer à la courbe maîtresse. Le remplacement de la solution protéique par le solvant débute à $\Pi = 2$ mN/m pour $C = 0.01$ g/L, $\Pi = 2$ et 5 mN/m pour $C = 0.05$ g/L et $\Pi = 23$ mN/m pour $C = 1$ g/L.
Avant le lavage, les courbes se juxtaposent sur la courbe maîtresse indiquant une bonne reproductibilité des mesures. Les facteurs d'échelle se superposent avec ceux obtenus sans lavage (fig. 5.16). Après le lavage, lorsque l'adsorption des protéines provenant du volume est nulle, Π ne suit plus la courbe maîtresse et devient stationnaire. Π dépend donc de l'adsorption des protéines dans la gamme de pressions de surface où le lavage a été effectué. De plus, puisque Π ne décroît pas après lavage, l'adsorption apparaît irréversible, suggérant une énergie de désorption très supérieure à k_BT à l'interface h/e.
Le lavage n'a été effectuée à l'interface a/e que pour l'isolat de blé et les résultats sont similaires à ce qui a été trouvé pour l'isolat de tournesol à l'interface h/e. On s'attend donc à des résultats similaires avec l'isolat de tournesol à l'interface air/eau, c'est à dire une adsorption irréversible des protéines et une augmentation de Π gouvernée par l'adsorption des protéines.

5.2 Modélisation cinétique

5.2.1 Période d'induction, premiers temps de latence

Les temps de latence t_{l_1} (fig. 5.15) suivent une loi de puissance C^{-p} où $p = 1.8 \pm 0.2$ à l'interface a/e et $p = 1.6 \pm 0.6$ à l'interface h/e. Cela est proche d'une loi de puissance en C^{-2}, signature de processus diffusif. En prenant comme mécanisme limitant l'adsorption diffusive des espèces amphiphiles, la concentration superficielle d'excès en fonction du temps s'écrit de la manière suivante [23] :

$$\Gamma(t) = 2C\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \tag{5.4}$$

Où C est la concentration d'isolat protéique en solution, D le coefficient de diffusion des espèces s'adsorbant à l'interface. Dans le cas de l'isolat de tournesol, on a montré par diffusion de la lumière, l'existence de deux populations, rapides et lentes ($D_{rapide} = 35 \pm 5$ μm^2/s, $R_{H,rapide} = 6 \pm 1$ nm et $D_{lent} = 2.8 \pm 0.4$ μm^2/s, $R_{H,lent} = 77 \pm 10$ nm). Le nombre d'espèces de la population lente est négligeable devant celui de la population rapide, on suppose donc que la concentration superficielle d'excès est contrôlée par l'adsorption de la population rapide (section 3.2.2).

Pour prédire un temps de latence t_{l_1} il est nécessaire d'estimer une concentration superficielle

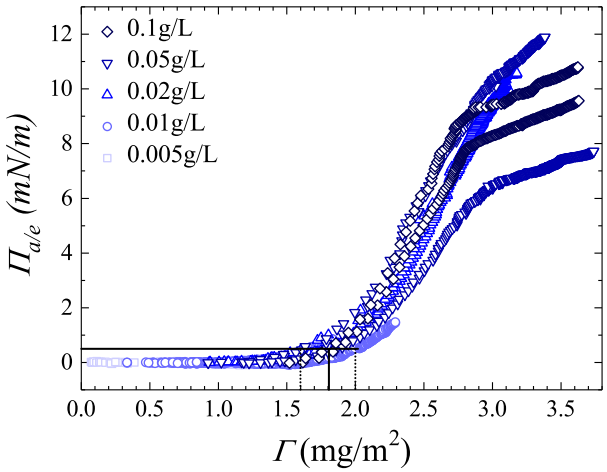


Fig. 5.14: Pression de surface en fonction de la concentration superficielle d'excès à l'interface air/eau. Le trait plein montre la concentration superficielle d'excès nécessaire à l'augmentation de la pression de surface, les pointillés correspondent aux incertitudes expérimentales de Γ pour $\Pi = 0.5$ mN/m.

d'excès latente Γ_{l_1} correspondant à la quantité de matière minimale produisant une pression de surface non nulle. On peut évaluer cette quantité par les mesures de pression de surface et de concentration superficielle d'excès effectuées par ellipsométrie (fig. 5.11 (b)) en parallèle sur la même interface a/e uniquement. On ne peut donc pas évaluer la pertinence de ce modèle avec les mesures à l'interface h/e. Les mesures et interprétations suivantes ne concerne que l'interface a/e. Les mesures des temps de latence étant proche de $\Pi = 0$ mN/m, on évalue la concentration superficielle d'excès latente à la pression de surface $\Pi = 0.5$ mN/m car cette mesure est significativement supérieure à la sensibilité de la mesure qui est de 0.1 mN/m.

La figure 5.14 montre la pression de surface en fonction de la concentration superficielle d'excès à l'interface a/e. La pression de surface atteint $\Pi = 0.5$ mN/m lorsque la concentration superficielle d'excès atteint $\Gamma_{l_1} = 1.8 \pm 0.2$ mg/m^2. L'incertitude est obtenue par la dispersion des courbes $\Pi(\Gamma)$. La modélisation du temps de latence s'écrit comme suit (provenant de l'eq. 5.4) :

$$t_{l_1} = \frac{\pi}{D}\left(\frac{\Gamma_{l_1}}{2C}\right)^2 \tag{5.5}$$

Sur la figure 5.15, on observe que les temps de latence expérimentaux sont plus élevés que ceux prédits par le modèle diffusif (eq. 5.5) d'un ordre de grandeur. On peut définir un coefficient de diffusion apparent D_a qui prend en compte une diminution de la diffusion dû à une barrière d'adsorption. Le coefficient de diffusion apparent s'écrit de la manière suivante [25] :

$$D_a = D.\exp^{\left(\frac{-2\varepsilon_a}{RT}\right)} \tag{5.6}$$

Avec ε_a l'énergie d'activation de la réaction d'adsorption (type loi d'Arrhenius), R la constante des gaz parfaits et T la température.

L'ajustement des données expérimentales donne $D_a = 2.3 \pm 0.5 \mu m^2/s$. Cela correspond à une énergie d'activation par protéine de $(1.4 \pm 0.2) k_B T$ à l'interface a/e. On remarque que ce coefficient de diffusion apparent est similaire à celui de la population lente $D_{lent} = (2.8 \pm 0.4) \mu m^2/s$.
Ainsi, la première étape d'adsorption des protéines à l'interface a/e apparaît guidée par la diffusion des protéines jusqu'à l'interface puis ralentie pendant l'adsorption.
Les mesures à l'interface h/e montrent des temps de latence plus courts qu'à l'interface a/e. On ne peut pas mesurer la concentration superficielle d'excès à l'interface h/e, ce qui empêche de faire une analyse similaire à celle effectuée à l'interface a/e.

5.2.2 Courbes maîtresses

L'ajustement des facteurs d'échelles avec la concentration en loi de puissance C^p où $p = 1.6 \pm 0.2$ est proche d'une loi de puissance en C^2. La démarche consiste à modéliser les facteurs d'échelle $\alpha(C)$ par le modèle d'adsorption diffusive (eq. 5.4) et d'évaluer les zones de la courbe maîtresse où le modèle diffusif est valable. Pour modéliser les facteurs d'échelle par le modèle diffusif, il est nécessaire de faire plusieurs approximations :

- A une valeur de pression de surface correspond une seule valeur de concentration superficielle d'excès, c'est à dire que la fonction $\Pi(\Gamma)$ est monotone.

- L'adsorption est irréversible comme on a pu le vérifier expérimentalement (fig. 5.13) par les expériences de lavage.

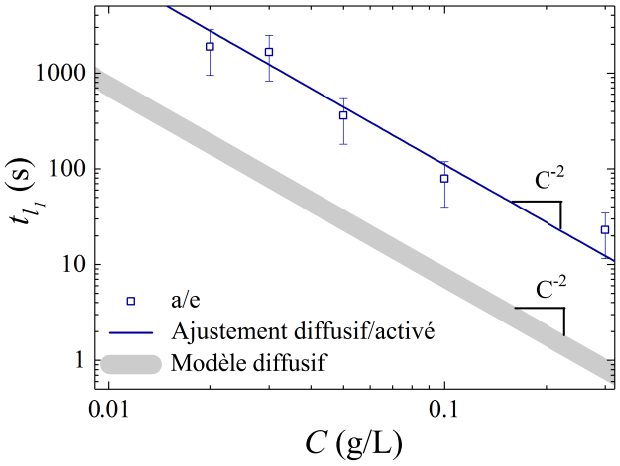


Fig. 5.15: Temps de latence t_{l_1} en fonction de la concentration, à l'interface a/e. Le trait foncé correspond au temps de latence prédit par le modèle diffusif (eq. 5.5) et le trait clair correspond à l'ajustement des mesures avec le coefficient de diffusion comme paramètre libre.

Les facteurs d'échelle α_Π qui ont servi à construire la courbe maîtresse en pression de surface permettent également la construction d'une courbe maîtresse en concentration superficielle d'excès, comme le montrent les graphiques de la figure 5.11, on peut donc écrire :

$$\Gamma(C,t) = \Gamma(C_{ref}, t_{ref}) \tag{5.7}$$

$$\text{avec} \quad t_{ref} = \alpha t$$

Où C_{ref} et t_{ref} correspondent respectivement à la concentration de la solution protéique et à l'âge de l'interface au moment de la mesure pour la courbe de référence ($C_{ref} = 0.1$ g/L).

En combinant les équations 5.4 et 5.7 on obtient :

$$2C\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} = 2C_{ref}\sqrt{\frac{D\alpha t}{\pi}} \tag{5.8}$$

$$\alpha = \left(\frac{C}{C_{ref}}\right)^2 \tag{5.9}$$

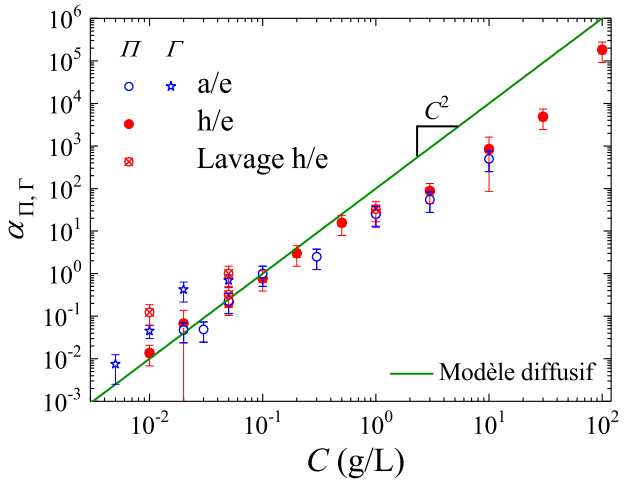


Fig. 5.16: Facteurs d'échelles α_Π et α_Γ en fonction de la concentration en isolat. Le trait plein correspond au modèle diffusif sans paramètre libre (eq. 5.9).

La figure 5.16 montre la correspondance entre le modèle diffusif et les mesures des facteurs d'échelle en fonction de la concentration d'isolat protéique en solution. Les facteurs d'échelle sont proches du modèle diffusif jusqu'à la concentration $C = 0.1$ g/L à l'interface a/e et $C = 0.5$ g/L à l'interface h/e. On peut donc identifier un régime d'adsorption contrôlé par la diffusion des protéines jusqu'aux pressions de surface des pseudo-plateaux. La juxtaposition des courbes n'est plus possible à partir de la sortie des pseudo-plateaux en pression de surface, donc pour des concentration d'isolat protéique en solution $C \geq 1$ g/L à l'interface a/e et $C \geq 0.2$ g/L à l'interface h/e. Cette impossibilité de

juxtaposition indique que la fin du pseudo-plateau est dépendant de l'âge de formation du film. Les temps d'entrée aux pseudo-plateaux (fig. 5.5) suivent les lois de puissance en C^{-p} où $p = 1.0 \pm 0.2$ à l'entrée des pseudo-plateaux à l'interface a/e, $p = 1.6 \pm 0.4$ à l'interface h/e. Donc à l'interface a/e le processus n'est plus diffusif à l'entrée des pseudo plateaux mais est encore diffusif pour l'interface h/e. A l'interface h/e, les temps de latences à la sortie du pseudo-plateau suivent une loi de puissance en C^{-p} où $p = 0.7 \pm 0.3$, donc la sortie du pseudo-plateau correspond à un processus non diffusif.
Ces pseudo-plateaux on permis d'identifier une pression de surface latente Π_{l2} qui est reportée sur les figures présentant les mesures de rhéologie interfaciale dilatationnelle (fig. 5.22). On remarque un lien entre ces pseudo plateaux et les processus de relaxation que l'on discutera.

5.2.3 Modélisation cinétique issue du profil optique

Les mesures des angles ellipsométriques en fonction du temps permettent d'obtenir l'évolution temporelle de la concentration superficielle d'excès. Le modèle diffusif (eq. 5.4) correspond à une évolution temporelle de la concentration superficielle d'excès en loi de puissance $\frac{1}{2}$. Les données expérimentales visualisées en échelle logarithmique en fonction du temps n'évoluent pourtant pas en loi de puissance $\frac{1}{2}$ malgré la correspondance des facteurs d'échelles servant à la construction des courbes maîtresses avec le modèle diffusif (fig. 5.16, fig. 5.11). Les mesures obtenues avec les concentrations d'isolat protéique en solution C comprises entre 0.02 et 0.2 g/L se rejoignent à un plateau temporel de concentration superficielle d'excès ($\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2) qui peut correspondre à une saturation de l'interface. Cela a conduit à utiliser un modèle d'adsorption diffusive prenant en compte la saturation du film interfacial. Il s'écrit de la manière suivante [22] :

$$\Gamma(t) = \Gamma_m \left[1 - \exp\left(\frac{-2C}{\Gamma_m} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \right) \right] \tag{5.10}$$

Où t est le temps, Γ_m la concentration de saturation du film interfacial, C la concentration des espèces en volume, D le coefficient de diffusion des espèces s'adsorbant à l'interface. Pour modéliser nos mesures on considère $D = D_{rapide}$ et C la concentration d'isolat protéique en solution.
La figure 5.17 montre la correspondance entre la modélisation par adsorption diffusive et les mesures. Le modèle est ensuite tracé pour de plus basses concentrations sans paramètre libre.

La modélisation de l'adsorption diffusive avec saturation est dans l'ordre de grandeur des mesures expérimentales. La concentration superficielle d'excès augmente à nouveau après un pseudo-plateau où $\Gamma = \Gamma_m$. Ce plateau temporel est d'autant plus court que la concentration en isolat protéique est élevée, il n'est plus visible pour $C > 1$ g/L. Cela correspond à une adsorption supplémentaire après le régime pseudo-stationnaire.
Dans le cas du lysozyme à l'interface a/e, par réflexion des rayons-X, la modélisation de la concentration superficielle d'excès montre deux plateaux interprétés par la formation d'une première couche

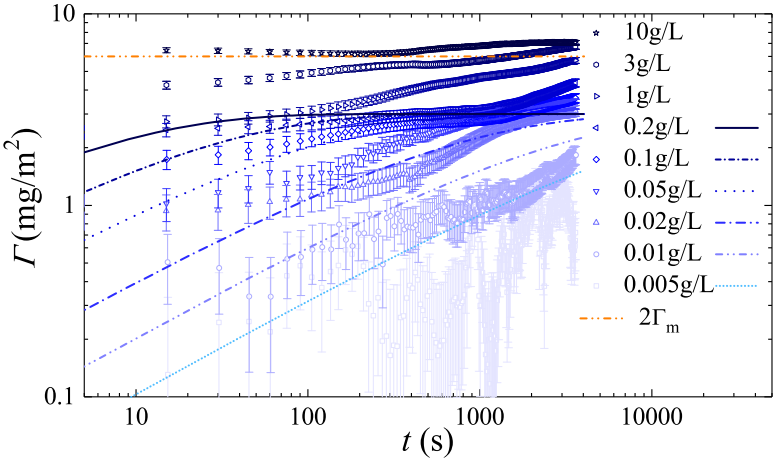


Fig. 5.17: Concentration superficielle d'excès en fonction du temps pour différentes concentrations d'isolat en solution, à l'interface a/e. Les lignes correspondent au modèle diffusif avec saturation (eq. 5.10) tracé à différentes concentrations d'isolat protéique en volume. La ligne horizontale en pointillés rouge correspond à $2\Gamma_m$

interfaciale dense et d'une seconde couche moins dense, sous la première [38]. On remarque que la valeur correspondant à $2\Gamma_m$, indiquée en pointillés (fig. 5.17), correspond à des pseudo-plateaux temporels visibles pour les mesures effectuées avec les solutions à 3 et 10 g/L d'isolat protéique en solution.

Les concentrations superficielles d'excès de latence Γ_{l_1} et de saturation Γ_m permettent respectivement d'évaluer l'aire moyenne occupée par une protéine lorsque que les protéines entrent en interactions et lors de la saturation de l'interface. On peut comparer le côté a du carré équivalent à l'aire par protéine et le rayon hydrodynamique en volume. Pour obtenir l'aire par protéine on utilise la masse molaire de l'hexamère de globulines de tournesol. La concentration superficielle d'excès latente Γ_{l_1} est obtenue expérimentalement à l'interface a/e (fig. 5.14). Cette dernière est également obtenue avec l'ajustement des temps de latence (fig. 5.2) par le modèle diffusif (eq. 5.5), aux deux types d'interface a/e et h/e. Les côtés des carrés équivalent aux aires protéique moyennes sont définis concentration superficielle d'excès latente a_l et à la saturation de la monocouhe a_m :

$$a_{l_1} = \sqrt{\frac{M_w}{\Gamma_{l_1} N_A}} \tag{5.11}$$

$$a_m = \sqrt{\frac{M_w}{\Gamma_m N_A}} \tag{5.12}$$

Où M_w est la masse molaire de l'hexamère de globuline de tournesol (300 kDa fig. 2.25) et N_A le nombre d'Avogadro.
a_l et a_m sont dans l'ordre de grandeur du diamètre hydrodynamique de la population rapide $2R_H$. Cela suggère que la déformation des protéines lors de l'adsorption est faible et que les protéines sont

Tab. 5.1: *Concentration superficielle d'excès latente et de saturation de la monocouche, côtés équivalents aux aires protéique moyennes et diamètre hydrodynamique*

	Γ_{l_1} (mg/m^2)	Γ_m (mg/m^2)	a_l (nm)	a_m (nm)	$2R_H$ (nm)
a/e	1.8±0.4	3.0 ± 0.2	17±1	13 ± 0.5	12 ± 2

peu compressibles avec la pression de surface, jusqu'à saturation de l'interface.

5.3 Modélisation structurale

5.3.1 Profil optique sur 1 h

A l'interface a/e, il a été possible de modéliser la concentration superficielle d'excès par le profil optique contrairement à l'interface h/e comme cela a été expliqué plus haut (fig. 5.8). Les mesures à l'interface h/e positives, croissantes puis négative et décroissante avec le temps et la concentration d'isolat protéique en solution donnent l'information suivante : l'indice de réfraction interfacial est d'abord plus grand que celui de l'hexadécane et augmente puis diminue en devenant plus faible que celui de l'hexadécane. L'augmentation de $I_{1,h/e}$ requiert un apport de matière. En revanche, la décroissance de $I_{1,h/e}$ peut être interprétée par une diminution de la densité du film ou une anisotropie optique du film. En considérant que le film formé est principalement dans l'eau, l'indice de réfraction interfacial n_L est modélisable par la fraction volumique en isolat protéique ϕ_p au sein de la couche interfaciale (eq. 2.40) par l'équation suivante :

$$n_L^2 = n_e^2(1-\phi_p) + n_p^2\phi_p \tag{5.13}$$

Où $n_e = 1.333$ est l'indice de réfraction de l'eau et $n_p = 1.503$ celui de l'isolat protéique (fig. 2.27).

Dans le cas où le film devient optiquement anisotrope, le paramètre de déviation I_1 s'écrit de la manière suivante :

$$I_{1,h/e} = \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\frac{(n_{L,\perp}^2(z) - n_h^2)(n_{L,\perp}^2(z) - n_e^2)}{n_{L,\perp}^2(z)} + (n_{L,\parallel}^2 - n_{L,\perp}^2) \right] \mathrm{d}z \tag{5.14}$$

Où n_0 est l'indice de réfraction de la phase légère (l'air ou l'hexadécane), $n_{L,\perp}^2$ et $n_{L,\parallel}^2$ sont respectivement, l'indice de réfraction du film interfacial perpendiculaire et parallèle à l'interface, z la hauteur, $z = 0$ à l'interface, $z > 0$ dans l'hexadécane et $z < 0$ dans l'eau.

$I_{1,h/e}$ diminue avec la différence entre les indices de réfraction interfaciaux parallèle et perpendiculaire à l'interface. Cependant, dans les limites expérimentales en temps et concentrations, l'anisotropie progressive du film aurait donc lieu uniquement à l'interface h/e et non à l'interface a/e puisque $I_{1,a/e}$ ne diminue ni avec le temps ni avec la concentration d'isolat protéique en solution (fig. 5.7).

$$I_{1,h} = \frac{(n_{h/L}^2 - n_h^2)(n_{h/L}^2 - n_e^2)}{n_{h/L}^2} H\phi_h \tag{5.15}$$

$$I_{1,e} = \frac{(n_{L/e}^2 - n_h^2)(n_{L/e}^2 - n_e^2)}{n_{L/e}^2} H(1-\phi_h) \tag{5.16}$$

$$I_{1,h/e} = I_{1,h} + I_{1,e} \tag{5.17}$$

Une autre interprétation possible de la décroissance de $I_{1,h/e}$ serait qu'une couche suffisamment peu dense se forme sous la première de manière à ce que la fraction protéique de la totalité du film soit plus basse. ϕ_p diminue et donc l'indice de réfraction interfacial n_L diminue (eq. 5.13). Lorsque n_L devient inférieur à n_h, $I_{1,h/e}$ diminue (eq. 5.1) au contraire de $I_{1,a/e}$ qui se mettrait à diminuer quand n_L deviendrait inférieur à n_e ce qui est impossible si le film est formé principalement dans l'eau.

Puisque l'approximation permettant de modéliser la concentration superficielle d'excès n'est pas valable à l'interface h/e, on utilise un modèle de profil optique en marche, comme celui montré à la figure 5.8. Cela permet d'interpréter quantitativement les mesures du paramètre de déviation $I_{1,h/e}$ à l'interface h/e. Le paramètre de déviation $I_{1,h/e}$ (eq. 5.1) s'écrit :

$$I_{1,h/e} = \frac{(n_L^2 - n_h^2)(n_L^2 - n_e^2)}{n_L^2} H \tag{5.18}$$

Où H est l'épaisseur du film, $n_h = 1.432$, $n_e = 1.333$. Plusieurs couples de l'indice de réfraction interfacial n_L et de l'épaisseur du film H correspondant à une même valeur $I_{1,h/e}$. La concentration superficielle d'excès associée à chaque couple (n_L,H) est calculée de la façon suivante :

$$\Gamma = \phi_p \rho_p H = \frac{(n_L^2 - n_2^2)}{(n_p^2 - n_2^2)} \rho_p H \tag{5.19}$$

En considérant le film totalement dans l'eau $n_2 = n_e$ ou dans l'hexadécane $n_2 = n_h$. ρ_p est la masse volumique des protéines et ϕ_p la fraction volumique d'isolat protéique dans le film.

Les couples de valeurs (n_L,H) associés au valeurs I_1 sont présentés à la figure 5.18 pour les interfaces a/e (a) et h/e (b). Les zones colorées de la figure 5.18 représentent les couples ne faisant pas varier l'angle de Brewster de plus de 0.1° (théorie des perturbations valable). Deux courbes iso-I_1 caractéristiques du pseudo-plateau et de la valeur mesurée à concentration et temps maximum sont tracées. Les valeurs de Γ indiquées sur la figure 5.18 aux extrema des courbes iso-I_1 sont calculées

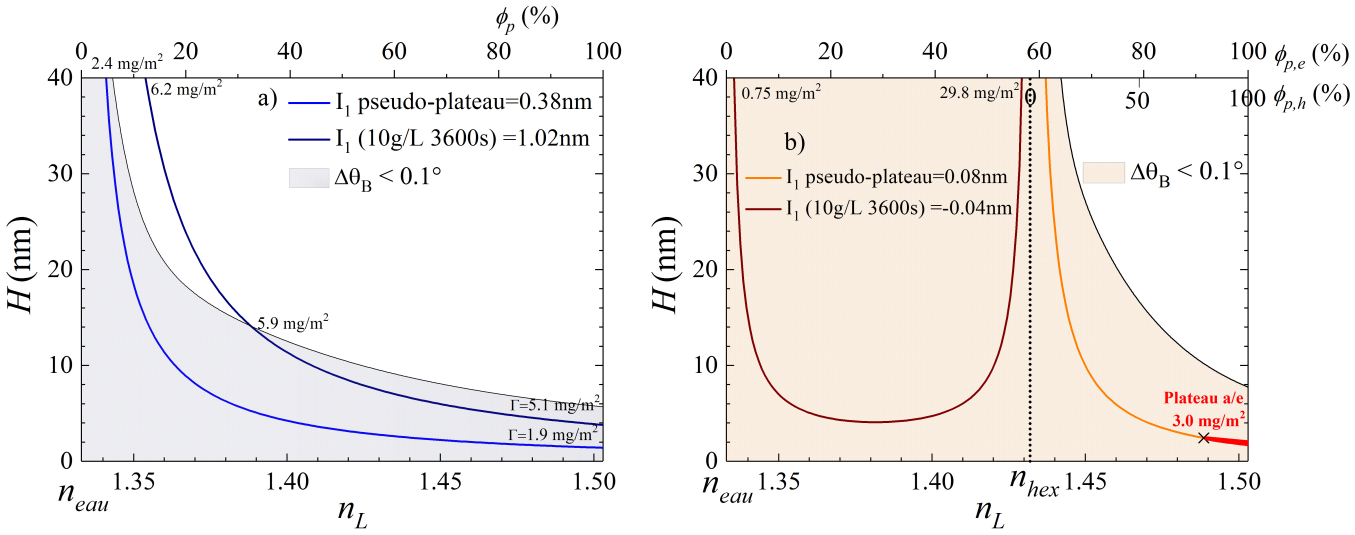


Fig. 5.18: La zone colorée représente les couples ne faisant pas varier l'angle de Brewster de plus de 0.1°. Les iso-I_1 tracés correspondent aux couples possibles (n_L,H) (eq 5.18), à l'interface a/e (a) et h/e (b) pour deux valeurs de I_1 obtenues expérimentalement. Les valeurs de I_1 sont caractéristiques de la saturation monocouche de l'interface et de l'adsorption maximale mesurée. L'axe supérieur donnant la fraction volumique en isolat protéique est obtenu par l'indice de réfraction interfacial (eq. 2.40). En considérant le film dans l'eau ou dans l'huile l'indice interfacial va respectivement de $n_e = 1.333$ ou $n_h = 1.432$ à $n_p = 1.503$.

par le profil en marche imposée (eq. 5.19). D'après la théorie des perturbations à l'interface a/e, $\Gamma = 3.0$ mg/m^2 lorsque $I_1 = 0.38$ nm et $\Gamma = 7.0$ mg/m^2 lorsque $I_1 = 1.02$ nm. Ces valeurs issues de la théorie des perturbations sont dans l'ordre de grandeur des valeurs de Γ obtenues aux extremum des courbes iso-I_1 à l'interface a/e ($1.9 - 2.4$ mg/m^2 pour $I_1 = 0.38$ nm et $5.1 - 5.9$ mg/m^2 pour $I_1 = 1.02$ nm). On remarque que le modèle en marche imposé sous estime les valeurs de Γ par rapport à la théorie des perturbations.

Le modèle de marche imposé est intermédiaire entre la théorie des perturbations et la modélisation en couches stratifiée. En faisant l'hypothèse que les pseudo-plateaux de I_1 aux interfaces a/e et h/e correspondent à la même valeur de Γ_m il est possible de déterminer un couple (n_L,H) correspondant à $\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2 à l'interface h/e. D'après la modélisation du profil optique en marche imposé, Pour $I_{1,h/e}$ correspondant au pseudo-plateau, le couple (n_L,H) permettant de calculer $\Gamma_m = 3.0$ mg/m^2 est $H = 2.4$ nm et $n_L = 1.488$. L'indice de réfraction interfacial correspond à $\phi_p = 91$ % (eq. 5.19) en considérant le film complètement dans l'eau et $\phi_p = 78$ % en considérant tout le film dans l'hexadécane. Cela correspond à un film fin et extrêmement dense. Pour I_1 mesuré avec la plus haute concentration d'isolat protéique en volume et le temps maximum,$I_1 = -0.04$ nm. les couples (n_L,H) pour ce dernier iso$-I_1$ correspondent, sur toute la courbe iso$-I_1$, à un film plus épais ($H \geq 4.0$ nm) et moins dense ($\phi \leq 58$ %) que lors du pseudo-plateau de I_1. Pour ce dernier régime le film ne peut pas être considéré complètement dans l'huile car la fraction protéique associé serait nulle.

5.3.2 Profil optique à temps plus long (61 h)

Lorsque le film interfacial est suffisamment épais et/ou dense, les angles ellipsométriques Δ et Ψ associés à la variation de l'angle de brewster ne peuvent pas être modélisés par un seul paramètre mais par deux paramètres indépendants.

Les mesures des angles ellipsométriques ont été effectuées pour des mesures à l'interface a/e avec des solutions à 10 g/L et 20 g/L en isolat protéique après 1 h. Pour la solution à 10 g/L les mesures à l'interface a/e ont également été effectuées après 61 h.

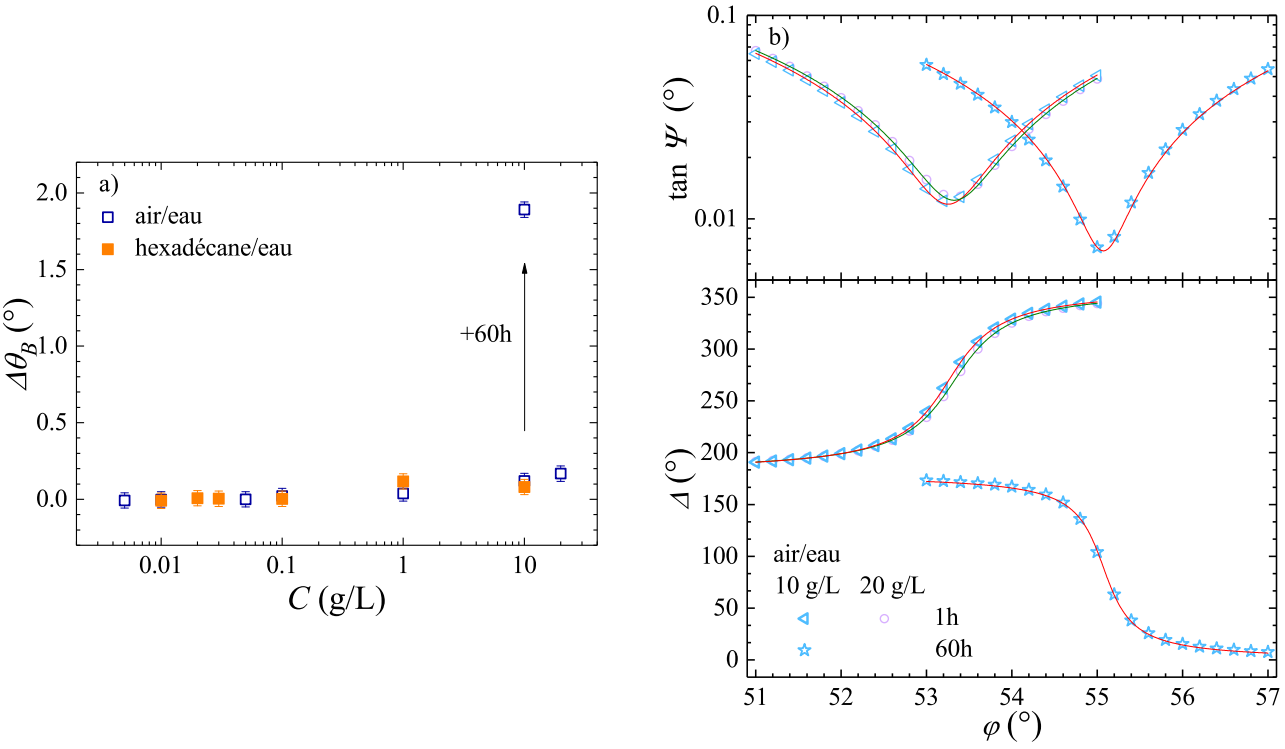


Fig. 5.19: a) Variation de l'angle de Brewster après 1h et 61h.
b) Angles ellipsométriques en fonction de l'angle d'incidence d'une interface a/e formée avec une solution de concentration $C = 10$ et 20 g/L âgée de 1 h pour les deux concentrations et âgée de 61 h pour la concentration à 10 g/L. Les traits correspondent à l'ajustement des angles ellipsométriques (modélisation eq. 2.25 de Δ eq. 2.20 et Ψ eq. 2.21)

L'angle de Brewster varie au delà des incertitudes de mesures par rapport à celui d'une interface vierge (fig. 5.19(a)) pour l'interface d'une solution de concentration 20 g/L après 1 h et 10g/L après 61 h. Il est alors possible de modéliser les angles ellipsométriques Δ et Ψ (fig. 5.19(b)) par un modèle d'une couche interfacial entre les deux milieux (section 2.1.4.1), d'épaisseur H et d'indice de réfraction n_L. Pour obtenir les incertitudes sur les ajustements des valeurs de n_L et H, on répète l'ajustement sur deux mesures obtenues avec la même concentration d'isolat protéique en volume au même âge de la surface. L'incertitude relative est de 0.5 % pour l'indice de réfraction interfacial et 6 % pour l'épaisseur H.

Pour la concentration à 10 g/L après 1h le film est peu dense avec une épaisseur similaire au vo-

lume hydrodynamique de la population rapide. On remarque que la théorie des perturbations et le modèle en couches stratifiées donnent des valeurs de concentrations superficielles d'excès similaires, indiquant bien que les deux modèles sont valables à la limite de variation de l'angle de Brewster de 0.1°. Pour une concentration en volume deux fois plus élevée, à 20 g/L, pour la même durée de 1 h, le film est légèrement plus épais et moins dense. Pour l'interface obtenue avec la concentration d'isolat en volume à 10 g/L, après 61h, le film s'est largement épaissi et sa fraction volumique en isolat protéique est restée constante et indique une bonne hydratation (70 % de solvant dans le film).

5.3.3 Turbidité d'une goutte pendante

En effectuant les mesures de tension de surface à l'interface hexadécane/eau pour la concentration $C = 10$ g/L, une augmentation de la turbidité de la goutte a été observée. La turbidité est due à la présence d'objets diffusants dans les longueurs d'onde du visible ($\lambda = 400$ à 800 nm). C'est un indicateur robuste de la présence d'agrégats dans une solution, d'ailleurs utilisé comme l'un des critères pour la potabilité de l'eau. L'évolution de la turbidité d'une goutte pendante de solution protéique dans l'air et dans l'huile est quantifiée pour trois ordres de grandeurs en concentration et cinq ordres de grandeurs en temps.
La figure 5.20 montre les images de gouttes pendantes pour une concentration de 10 g/L à l'interface h/e. La baisse de tension de surface est visible par l'allongement de la goutte avec le temps. La goutte devient également plus turbide, indiquant la présence d'agrégats. Après le temps t_3, une nouvelle goutte est formée à partir de la même solution provenant du même flacon. Cette procédure permet

Tab. 5.2: Indice de réfraction interfacial, fraction volumique en protéines, Epaisseurs et concentrations superficilles d'excès par le modèle en marche et la théorie des perturbations

C (g/L)	n_L	ϕ_p (%)	H (nm)	Γ_{marche} (mg/m^2)	$\Gamma_{th.pertu.}$ (mg/m^2)
10 (1h)	1.390±0.007	32 ± 4	15±1	6 ± 1	7.0 ± 0.2
10 (61h)	1.386±0.007	30 ± 4	130±8	53 ± 7	X
20 (1h)	1.370±0.007	21 ± 4	25±2	7 ± 1	X

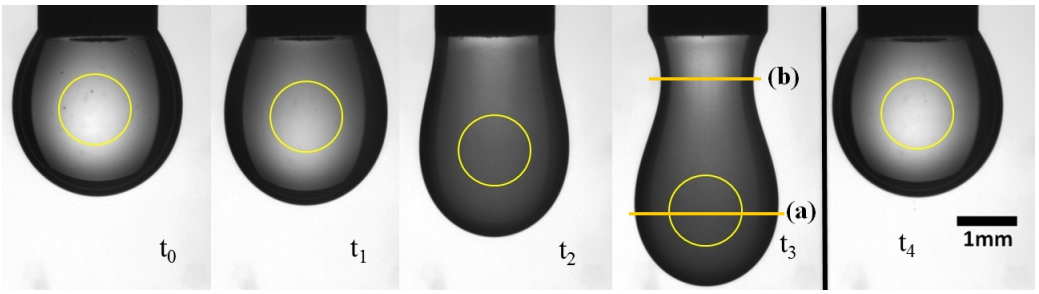


Fig. 5.20: Série de clichés de gouttes pendantes de solutions de protéines de tournesol à 10 g/L dans l'hexadécane pour la mesure du niveau de gris. Le cercle central correspond aux pixels pris en compte pour moyenner le niveau de gris. $t_0 < 60$ s, $t_1 = 1440$ s ,$t_2 = 3960$ s, $t_3 = 5520$ s. Une nouvelle goutte est formée après t_3. A t_4, la nouvelle goutte est âgée de moins de 60 s.

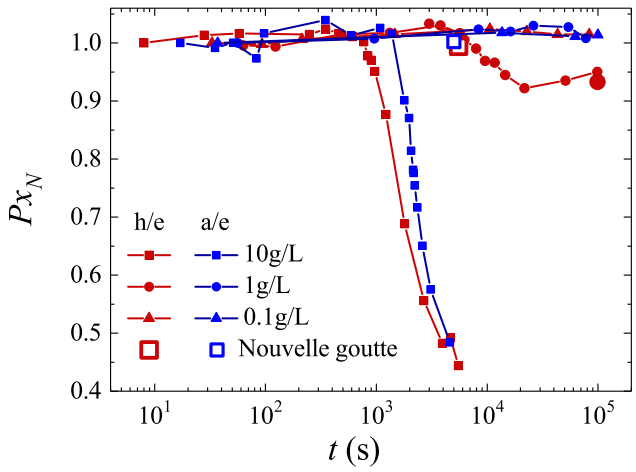


Fig. 5.21: Niveau de gris normalisé par le diamètre, en fonction du temps. Le niveau de gris de la nouvelle goutte formée à la fin de la mesure est marqué par le symbole ★

de mesurer la turbidité d'une solution n'ayant pas été en contact avec l'hexadécane. La nouvelle goutte est transparente, suggérant que l'interface h/e est nécessaire pour induire de l'agrégation. La turbidité est plus élevée là où le diamètre de la goutte est le plus grand (fig. 5.20, t_3, (a) et (b)), indiquant que la turbidité dépend du chemin optique dans le volume de la goutte et pas uniquement à travers les interfaces de chaque côté de la goutte. Cela suggère que les agrégats induits par l'interface se décrochent pour se disperser dans le volume. Pour quantifier l'évolution de la turbidité, on mesure le niveau de gris moyen dans la goutte. La valeur des pixels moyennés est à l'intérieur d'un cercle centré à l'intersection entre l'axe de symétrie verticale de la goutte et le diamètre horizontal le plus grand (fig. 5.20 (a)). Le niveau de gris mesuré à un temps t est normalisé par le niveau de gris de la goutte immédiatement après sa formation et par le diamètre (fig. 5.20 (a)) qui correspond au chemin optique d'un rayon lumineux passant par la centre du cercle dessiné :

$$Px_N = \frac{Px(t)}{Px(0)} \frac{D(0)}{D(t)} \tag{5.20}$$

Où Px_N est le niveau de gris normalisé, $Px(t)$ et $D(t)$ sont respectivement le niveau de gris moyenné et le diamètre horizontal maximal de la goutte au temps t, $t = 0$ s correspond au moment de formation de la goutte. Le niveau de gris normalisé est égal à 1 à $t = 0$ s, lorsque la goutte vient d'être formée et est transparente. Le niveau de gris diminue quand la turbidité augmente.

La figure 5.21 montre le niveau de gris normalisé P_{x_N} (eq. 5.20) en fonction du temps aux interfaces a/e et h/e pour différentes concentrations en isolat protéique, en solution.

A l'interface a/e, pour la plus forte concentration ($C = 10$ g/L), le niveau de gris est constant puis diminue avec le temps à partir de 1400 s. Une nouvelle goutte est formée à 5.10^3 s. Cette goutte est transparente, indiquant que la solution dans le capillaire en acier et le tuyau en téflon n'est pas devenue turbide, contrairement à la goutte précédente qui a été en contact prolongé avec l'air. Pour

les concentrations 1 et 0.1 g/L, la goutte reste transparente dans la limite du temps de mesure (10^5s). A l'interface h/e, la décroissance du niveau de gris est observée pour des concentrations en isolat protéique de 10 et 1 g/L, respectivement après $7.8.10^2$ s et $6.3.10^3$ s. Une nouvelle goutte de la solution à 10 g/L est formée après $5.5.10^3$ s, également transparente, indiquant donc que l'interface h/e est nécessaire à l'augmentation de turbidité de la goutte. En revanche, on s'aperçoit que la solution à 1 g/L devient turbide indépendamment de la présence d'interface pour des temps suffisamment long ($t > 8.6.10^4$ s).

Le pH d'une solution non tamponnée en contact l'air ambiant, peut s'acidifier à cause du CO_2 gazeux se dissolvant dans l'eau (pKa= 6.4). Puisque l'isolat de tournesol diminue en solubilité avec le pH, le pH a été mesuré pour une solution d'isolat protéique à 10 g/L. Immédiatement après préparation le pH est de 9.7. Après 1h de contact avec l'air ou l'hexadécane le pH est respectivement de 9.6 et 9.5. Cette baisse de pH est trop faible pour diminuer la solubilité des protéines en solution (fig. 3.2) et n'est donc pas responsable de l'augmentation de la turbidité. La nature des interactions mises en jeu lors de l'agrégation reste à élucider.

5.4 Viscoélasticité dilatationnelle interfaciale

Les mesures sont effectuées aux interfaces air/eau (a/e) et hexadécane/eau (h/e) pour des concentrations d'isolat protéique en solution allant respectivement de 0.02 à 10 g/L et 0.0015 à 100 g/L. La déformation, $\frac{\Delta A}{A} = 5$ % avec A la surface de la goutte, est suffisamment faible pour être dans le domaine de déformation linéaire (fig. 2.20). La fréquence d'oscillation, $f = 0.1$ Hz, est choisie de manière à ce que l'adsorption ou la désorption soit négligeable devant le temps de la mesure.

La figure 5.22 montre les modules élastiques E', visqueux E'' et le facteur de perte $\frac{E''}{E'}$ en fonction de la pression de surface Π, aux interfaces a/e (fig. 5.22 a) et h/e (fig. 5.22 b) pour différentes concentrations en isolat protéique dans la solution. Les modules élastiques et visqueux ainsi que le rapport $\frac{E''}{E'}$ augmentent en fonction de la pression de surface en formant une courbe maîtresse jusqu'aux valeurs de Π correspondant à l'entrée des pseudo-plateaux des courbes maîtresses en pression de surface. $\Pi_{l_2} = 15 \pm 2$ mN/m à l'interface a/e et $\Pi_{l_2} = 22 \pm 3$ mN/m à l'interface h/e (fig. 5.1). Le module visqueux est maximum à aux pseudo-plateaux en pression de surface. Cela coïncide avec le maximum du facteur de perte $\frac{E''}{E'}$, qui est une signature de processus de relaxation. De plus, pour $\Pi \geq \Pi_{l_2}$, E' ne forme plus de courbe maîtresse en fonction de la pression de surface et devient plus bas pour une concentration en isolat protéique en solution plus grande. Pour $\Pi \geq \Pi_{l_2}$, E'' décroît avec la pression de surface. Le rapport $\frac{E''}{E'}$ décroît également en fonction de la pression de surface.

Le module d'elasticité dilatationelle interfacial peut s'écrire de la manière suivante [43, 56, 190] :

$$E' = \frac{d\Pi}{d\ln\Gamma} \tag{5.21}$$

D'après l'équation 5.21, lorsque la fonction $E'(\Pi)$ est continue, la concentration superficielle d'ex-

cès contrôle l'élasticité interfaciale. A l'inverse, lorsque $E'(\Pi)$ ne forme plus de courbe maîtresse, l'élasticité ne dépend plus uniquement de la concentration superficielle d'excès mais également du temps nécessaire pour atteindre une pression de surface donnée. Le passage de la courbe maîtresse $E'(\Pi)$ à la courbe non maîtresse a lieu lors pseudo-plateaux visible pour $\Pi(\alpha_{\Pi} t$ et $\Gamma(t)$ et coïncide avec un maximum de $\frac{E''}{E'}$, signature de processus de relaxation. Le premier régime de formation est donc défini par la courbe maîtresse de $E'(\Pi)$ où le film est purement élastique et le second régime correspond aux pressions de surface où E' ne forme plus de courbe maîtresse. Ces deux régimes sont délimités par des pseudo plateaux temporelles en pression de surface et concentration superficielle d'excès.

5.5 Discussion et conclusion

L'étude des cinétiques d'adsorption et des structures du film interfacial formé par l'isolat de protéines de tournesol montrent de grandes similitudes aux interfaces air/eau et hexadécane/eau. Trois régimes distincts sont définis par leur cinétique d'adsorption et leur évolution structurale comme le montre le schéma 5.23.

Les courbes maîtresses de l'évolution temporelle de pression de surface et de concentration superficielle d'excès permettent d'interpréter le premier régime par une adsorption contrôlée par la diffusion des protéines, du volume à l'interface, avec un passage à l'interface ralenti eventuellement par une

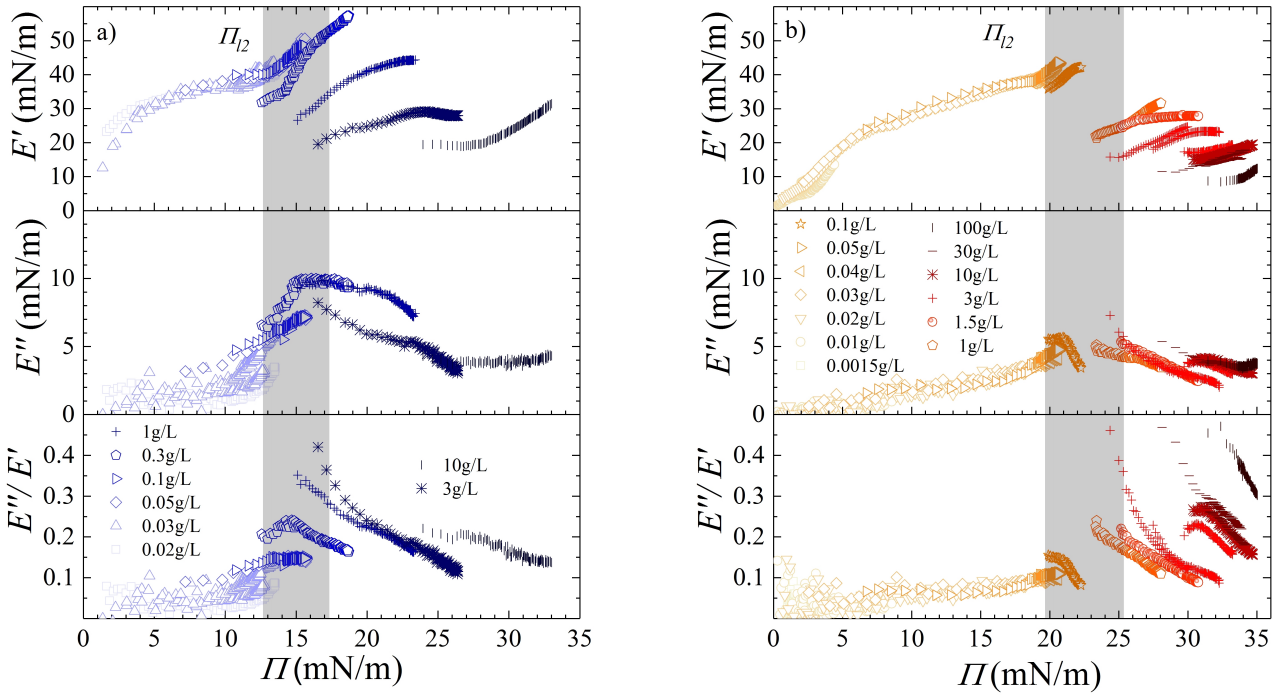


Fig. 5.22: Modules élastique E', visqueux E'' et facteur de perte $\frac{E''}{E'}$ aux interfaces a/e (a) et h/e (b). Les bandes grisées correspondent aux pseudo-plateaux identifiés dans les courbes maîtresses en pression de surface (fig. 5.11).

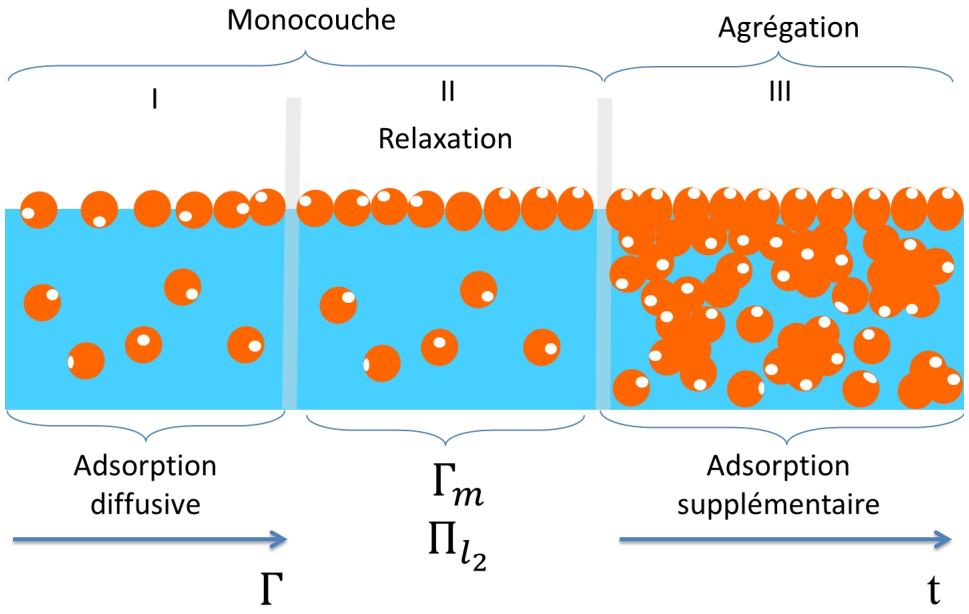


Fig. 5.23: Schéma de formation du film interfacial aux interfaces air/eau et hexadécane/eau. Le point blanc sur les protéines indique uniquement l'orientation des protéines.

barrière d'adsorption, plus grande à l'interface air/eau qu'à l'interface hexadécane/eau. Ce premier régime prend fin à la saturation d'un film monocouche. A l'interface a/e, les côtés des carrés équivalents aux aires protéiques moyennes sont proches du diamètre hydrodynamique, ce qui suggère que les protéines sont faiblement déformées lors de l'adsorption monocouche jusqu'à la saturation interfaciale. Durant ce régime, le film est purement élastique et dépend uniquement de la quantité de protéines à l'interface (fig. 5.23).

Le second régime est défini par l'augmentation du facteur de perte, caractéristique de processus de relaxation. Ce régime est également défini par les pseudo-plateaux de pression de surface et de concentration superficielle d'excès en fonction du temps (fig. 5.23).

Le troisième régime dépend du temps et est défini par une adsorption supplémentaire produisant une nucléation d'agrégats peu denses se libérant dans le volume. Le régime d'agrégation est associé à la fin de la $E'(\Pi)$ ne formant plus de courbe maîtresse. Ce comportement de E' a également été obtenu avec un film de β-Lacto globuline (=BLG) à l'interface a/e [191] lorsque le pH du solvant correspond au point iso électrique de la BLG. Dans le cas de cet article, ce comportement de E' est attribué à des processus de relaxations. On remarque qu'au point iso-électrique, les interactions électrostatiques sont très limitées et que l'agrégation est d'autant plus probable.

Ce comportement de E' a également été observé pour un isolat de protéines de soja et pour la caseinate de sodium à l'interface h/e [192, 193]. D'après ces articles, cela est principalement dû aux réarrangements interfaciaux et à la formation de multi-couches de protéines.

Notre interprétation s'appuyant sur les différentes mesures présentées dans ce chapitre sont en accord avec ces articles et apportent une chronologie des processus : Une saturation interfaciale limitée par la diffusion des espèces s'adsorbant, pendant laquelle le film est purement élastique. A la satu-

ration, interfacial, des processus de relaxation du film, induits par la pression de surface ont lieu et permettent une agrégation sous la surface puis la libération d'agrégats dans le volume, dans le cas des protéines de tournesol aux interfaces a/e et h/e.

6. DISCUSSION : CINÉTIQUES D'ADSORPTION ET ÉVOLUTIONS STRUCTURALES DE PROTÉINES VÉGÉTALES AUX INTERFACES FLUIDES

Dans ce chapitre, les résultats des études interfaciales obtenues avec les différentes protéines végétales sont regroupés et comparés avec la littérature existante afin de dégager des similitudes et des singularités obtenues avec les différents isolats. Ce chapitre reprend les résultats obtenus avec les isolats de blé et de tournesol mais présente aussi de nouveaux résultats obtenus avec les protéines de colza. Pour comparer les comportements associés à la nature des protéines, on utilise les mesures temporelles, à l'interface air/eau, de pression de surface, de concentration superficielle d'excès et de rhéologie dilatationnelle interfaciale, obtenues avec les isolats de tournesol (pureté 85 %), de colza (pureté 100 %) et de blé (pureté 100 %) pour des concentrations allant de 5.10^{-3} g/L à 10 g/L.

6.1 Courbes maîtresses

La figure 6.1 montre les courbes maîtresses obtenues pour les différents isolats avec comme courbes de références, celles obtenues avec une concentration d'isolat protéique $C_{ref} = 0.1$ g/L. Les concentrations d'isolat protéique vont de 2.10^{-2} g/L à 10 g/L pour le tournesol, de 5.10^{-3} g/L à 10 g/L pour le colza et de 10^{-2} g/L à 10 g/L pour le blé. La courbe maîtresse de l'isolat de blé (publication, chapitre 4) étant réalisée avec les données à 1 g/L comme référence, a été décalée pour être directement comparable aux autres données. Des courbes maîtresses peuvent être obtenues pour les trois isolats étudiés. Les courbes obtenues avec l'isolat de tournesol et de colza se recouvrent à partir de $\Pi = 13 - 14$ mN/m. Les mesures effectuées à 0.01 g/L ont été ajoutées pour comparer les temps de latence des courbes maîtresses mais sont à prendre avec précautions à cause d'un effet de déplétion du volume. Cette déplétion du volume est moins visible pour l'isolat de colza à cause d'une augmentation de pression de surface plus faible (6 mN/m) au bout de 1 h que pour l'isolat de blé (20 mN/m). L'isolat de colza montre le temps de latence normalisé le plus court, suivi de l'isolat de blé puis de l'isolat de tournesol. Les temps de latences seront discutés plus en détails, dans le paragraphe suivant. Pour l'isolat de tournesol, l'inflexion est suffisamment forte pour correspondre à un pseudo-plateau temporel de pression de surface ($\Pi_{l2} = 15 \pm 2$ mN/m). Une inflexion moins marquée est visible pour l'isolat de colza ($\Pi_{l2} = 17 \pm 3$ mN/m). Enfin, deux inflexions sont visibles pour l'isolat de blé ($\Pi_{l2} = 9 \pm 2$ mN/m et $\Pi_{l2}^{'} = 24 \pm 2$ mN/m). La première inflexion n'a pas été mise en évidence dans le chapitre 4 car les faibles concentrations soumises aux effets de déplétion n'ont pas été étudiées. Pour la concentration maximale utilisée, la pression de surface au bout de 1 h est de

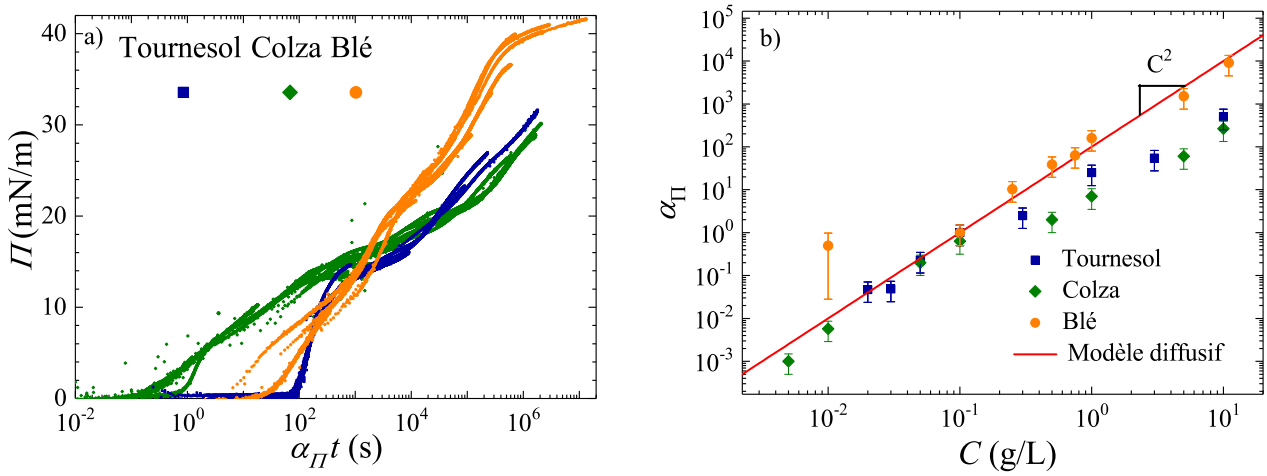


Fig. 6.1: a) Pression de surface en fonction du temps normalisé par le facteur d'échelle α_Π à différentes concentrations d'isolat protéiques en solution, pour les isolats de blé, de tournesol et de colza à l'interface a/e. La concentration de référence est 0.1 g/L.
b) Facteurs d'échelles des courbes maîtresses en fonction de la concentration d'isolat.

$\Pi = 42 \pm 2$ mN/m pour l'isolat de blé et avec l'isolat de tournesol et de colza $\Pi = 31 \pm 2$ mN/m. Les valeurs absolues maximales de pression de surface traduisent une activité de surface des protéines de blé plus importante que celles des protéines de tournesol et de colza. On rappelle que pour l'isolat de blé, trois régimes sont définis par les variations de pentes du module élastique E' aux pressions de surface $\Pi_{c1} = 19$ mN/m et $\Pi_{c2} = 31$ mN/m alors que pour l'isolat de tournesol seulement deux régimes sont définis avec E' dont la limite est indifféremment définie par $\Pi_{l2} = 15 \pm 2$ mN/m et $\Gamma_m = 3.0 \pm 0.2$ mg/m^2, à l'interface a/e, car contrairement aux gliadines, le régime de transition vers une monocouche saturée est confondu avec le régime de vieillissement pour l'isolat de tournesol, les processus de relaxation ne permettent pas une adsorption supplémentaire dans le film monocouche.
La figure 6.1 (b) montre les facteurs d'échelle en fonction de la concentration protéique en solution. Le trait plein correspond à un processus purement diffusif ($\alpha_\Pi \propto \left(\frac{C}{C_{ref}}\right)^2$ eq. 5.9). L'incertitude relative (50 %) est évaluée avec la reproductibilité des mesures et les maximum et minimum des facteurs d'échelle permettant le recouvrement de la courbe de référence. Les facteurs d'échelle obtenus avec les trois isolats augmentent avec la concentration d'isolat protéique en solution et suivent le modèle diffusif jusqu'à $C = 0.1$ g/L pour l'isolat de tournesol et de colza, ce qui correspond au premier régime et jusque 10 g/L pour l'isolat de blé ce qui correspond au trois régimes énoncés précédemment.

6.2 Temps de latence

Les temps de latence ont été obtenus pour les trois isolats par les courbes d'évolution temporelle de pression de surface.
La figure 6.2 montre les temps de latence en fonction de la concentration d'isolat protéique en solu-

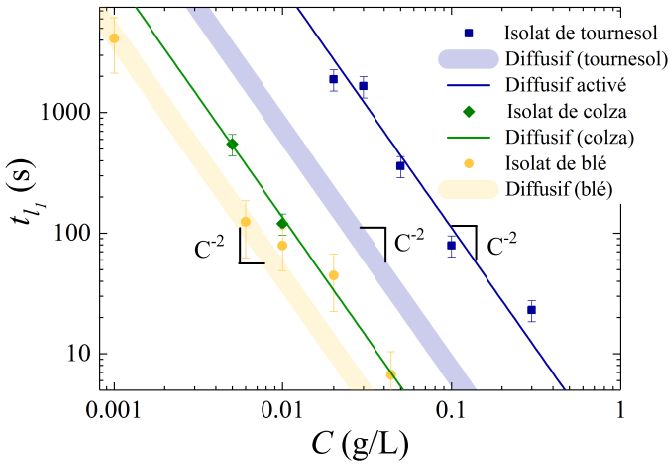


Fig. 6.2: Temps de latence en fonction de la concentration d'isolat protéique en solution. Les traits épais correspondent à la prédiction diffusive pour l'isolat de blé (jaune) et de tournesol (bleu) (eq. 5.5). Les traits fins correspondent à l'ajustement du coefficient de diffusion apparent pour le tournesol et à la concentration superficielle d'excès latente pour le colza (eq. 5.6).

tion pour les trois isolats. Les temps de latence obtenus pour l'isolat de blé, de colza et de tournesol diminuent avec la concentration en solution et sont proches d'une loi de puissance en C^{-2}, caractéristique de processus diffusif. Les coefficients de diffusion mesurés par diffusion dynamique de la lumière et la concentration superficielle d'excès latente, obtenue par mesure de la concentration superficielle d'excès et de la pression de surface en parallèle, permettent de tracer la prédiction diffusive pour l'isolat de blé et de tournesol. Les traits épais jaune et bleu correspondent à la prédiction diffusive pour les isolats de de blé et de tournesol (eq. 6.2). L'épaisseur des traits correspond à l'incertitude sur la prédiction du temps de latence associée aux incertitudes sur D et Γ_{l_1}. Le trait fins vert correspond à l'ajustement des données avec un modèle diffusif pour lequel un coefficient de diffusion apparent D_a est utilisé comme paramètre libre pour le tournesol. Le trait fins bleu correspond à l'ajustement des données avec un modèle diffusif pour lequel une a concentration superficielle d'excès latente Γ_{l_1} est utilisé comme paramètre libre pour le colza (eq. 6.2).

$$t_{l_1} = \frac{\pi}{D}\left(\frac{\Gamma_{l_1}}{2C}\right)^2 \tag{6.1}$$

$$D_a = D.\exp^{\left(\frac{-2\varepsilon_a}{RT}\right)} \tag{6.2}$$

Pour l'isolat de blé, le modèle diffusif correspond aux points expérimentaux pour des concentrations en solutions jusque 0.01 g/L. Pour des concentrations supérieures, les temps de latence observés avec l'isolat de blé sont plus grands que la prédiction diffusive.

Pour l'isolat de tournesol, la prédiction diffusive est un ordre de grandeur plus courte que les mesures expérimentales. Pourtant les temps de latence suivent une loi de puissance en C^{-2}. Les points expérimentaux suivent un modèle diffusif avec un coefficient de diffusion apparent $D_a = 2.3 \pm 0.5$

μm^2/s. Cela est attribué à une barrière d'adsorption $\varepsilon_a = 1.4 \pm 0.2$ K$_B T$, (eq. 5.6). On rappelle que la population lente trouvée pour l'isolat de tournesol a pour coefficient de diffusion $D_{lent} = 2.8 \pm 0.4$ μm^2/s, cependant la proportion en nombre de la population lente est négligeable devant la population rapide qui diffuse plus rapidement à l'interface. On suppose donc que ces temps de latences sont guidés par la diffusion de la population rapide et une barrière d'adsorption plutôt que par la diffusion de la population lente. La barrière d'adsorption peut suggérer qu'une faible quantité d'impuretés est initialement adsorbée, insuffisantes pour augmenter la pression de surface au dessus des incertitudes de mesures mais suffisante pour ralentir l'adsorption.
Pour le colza, l'ajustement des temps de latence par le modèle diffusif, avec $\Gamma_{l_1 aj} = 1.2$ mg/m^2 comme paramètre libre, donne une valeur en accord avec la littérature ($\Gamma_{l_1} = 1$mg/m^2 fig. 1.32 [127]).

Les temps de latence mesurés avec les isolats de colza et de blé, dont la pureté en protéines est proche de 100 %, sont dans l'ordre de grandeur de la prédiction diffusive et de la concentration superficielle d'excès latente. En revanche, pour l'isolat de tournesol, moins pur (85 % en protéines), la prédiction diffusive nécessite de prendre en compte une barrière d'adsorption. Cela suggère que la présence d'impuretés dans l'isolat puisse ralentir l'adsorption des protéines.

6.3 Concentration superficielle d'excès

La concentration superficielle d'excès latente (Γ_{l_1}) correspond à la sortie du régime des gaz parfaits, concentration à laquelle les composés adsorbés commencent à interagir latéralement. La concentration superficielle saturante (Γ_m) correspond à la quantité maximale de protéines adsorbées en monocouche à l'interface, cette valeur est déterminée par ajustement d'un modèle d'adsorption diffusive qui prend en compte la saturation de l'interface. Pour ces valeurs, on peut évaluer le côté du carré équivalent à l'aire des protéines adsorbées, lorsqu'elles commencent à interagir latéralement a_l et lorsqu'elles sont comprimées au maximum a_m :

$$a_{l_1} = \sqrt{\frac{M_w}{\Gamma_{l_1} N_A}} \tag{6.3}$$

$$a_m = \sqrt{\frac{M_w}{\Gamma_m N_A}} \tag{6.4}$$

Tab. 6.1: Coefficients de diffusion et concentrations superficielle d'excès latentes utilisées (fig. 6.2, traits épais) et ajustées (D_a et $\Gamma_{l_1 aj}$ fig. 6.2, traits fins) pour tracer la prédiction diffusive des temps de latences.

Isolat protéique	Coefficient de diffusion (μm^2/s)	Γ_{l_1} (mg/m^2)
Tournesol	$D_a = 2.3 \pm 0.5$ et $D = 35 \pm 5$	1.8±0.2
Colza	80 ± 20	$\Gamma_{l_1 aj} = 1.2 \pm 0.2$
Blé	45 ± 10	0.5±0.1

Où M_w est la masse molaire des protéines considérés et N_A le nombre d'Avogadro.
Les valeurs des côtés équivalents à l'aire par protéine sont indiquées dans le tableau 6.2 avec les diamètres hydrodynamiques $2R_H$ obtenus par diffusion dynamique de la lumière et les masses molaires M_w correspondant aux principales protéines de chaque isolat.

Tab. 6.2: Concentration superficielle d'excès latente Γ_{l_1} et saturante Γ_m, côté du carré équivalent à l'aire protéique moyenne a_l et a_m, diamètre hydrodynamique $2R_H$ et masse molaire M_w.

Isolat protéique	Γ_{l_1} (mg/m^2)	Γ_m (mg/m^2)	a_{l_1} (nm)	a_m (nm)	$2R_H$ (nm)	M_w (kDa)
Tournesol	1.8±0.2	3.0±0.2	17±1	12.9 ± 0.4	12 ± 2	300
Colza	1.2±0.2	/	4.4±0.3	/	5 ± 1	13
Blé	0.5±0.1	3.1±0.2	11±1	4.4 ± 0.2	10 ± 2	35

Pour l'isolat de tournesol, la masse molaire de l'hexamère est utilisée pour le calcul des aires des côtés équivalents aux aires protéiques moyennes car les mesures de microcalorimétrie ont montré l'absence de trimères non dénaturés. On trouve a_{l_1} légèrement plus élevé que a_m qui apparaît égale au diamètre hydrodynamiques $2R_H$. Cela montre que, d'une part les protéines sont peu étalées dans les premiers moments de l'adsorption, pendant le régime des gaz parfaits et que d'autre part, la compression due à l'adsorption des protéines réduit peu le diamètre protéique moyen. On peut supposer un caractère rigide des protéines, qui limite l'étalement sur une interface vierge et limite le repliement lors de la compression induite par la pression de surface.
En ce qui concerne l'isolat de colza, seulement a_{l_1} peut être calculé, il est similaire au diamètre hydrodynamique des albumines de colza en solution. Γ_m n'a pas été déterminé par manque de mesures ellipsométriques. Cela montre également un faible étalement interfacial pendant les premiers moments de l'adsorption, en accord avec la structure très stable des albumines de colza.
Pour l'isolat de blé, a_{l_1} est comparable au diamètre hydrodynamique. Les protéines ne semblent donc pas plus étalées en surface qu'en solution, en revanche lorsque le film est saturé, a_m est réduit d'un facteur deux. Cela montre l'aspect compressible des gliadines lors de l'adsorption au delà du régime gazeux. cela est en accord avec la structure labile des gliadines.

Les concentrations superficielles d'excès des monocouches saturées obtenues avec l'isolat de blé et de tournesol sont similaires et sont dans l'ordre de grandeur de ce qui a été trouvé dans la littérature pour d'autres protéines :

6.4 Rhéologie dilatationnelle des films protéiques

La méthode de la goutte pendante oscillante permet de quantifier les propriétés rhéologiques par rhéologie dilatationnelle interfaciale. La figure 6.3 montre les modules élastiques, visqueux et le facteur de perte en fonction de la pression de surface pour les isolats de tournesol, de colza (a) et de blé (b) à différentes concentrations d'isolat protéique en solution. Les mesures effectuées avec les isolats de tournesol et de colza sont présentées sur le même graphique pour faciliter les comparaisons. En

Tab. 6.3: Concentration superficielle d'excès pour d'autres protéines, animales et végétales

Référence	Protéines	Solvant	Γ (mg/m^2)
[194]	Glycinine	air / eau, pH 3.0 et 6.7	3.0±0.1
[195]	β-caséine	air/eau, pH 7, I= 0.1 M, par ellipsométrie et radioactivité	2.6±0.1
[196]	β-caséine	air et n-décane/eau, pH 7, I= 0.1 M par ellipsométrie et radioactivité	2.4±0.4
[196]	Lysozyme	air/eau, pH 7, I= 0.1 M par ellipsométrie et radioactivité	3.0
[196]	Albumine de sérum bovin	air / eau, pH 7, I= 0.1 M	3.2
[40]	Ovalbumine	air / eau, pH 3.7 à 8.0, I = 0.05 M	2.0±0.1

effet, ces deux lots présentent une grande similarité dans l'évolution des modules élastiques et visqueux avec la pression de surface, contrairement aux gliadines.

Les modules élastiques E' obtenus avec les isolats de tournesol et de colza augmentent avec la pression de surface Π jusqu'à une valeur maximale, en formant une courbe maîtresse indépendante de la concentration d'isolat en solution. Le facteur de perte est compris entre 0 et 0.1 jusqu'aux pseudo-plateaux de pression de surface trouvés avec les courbes maîtresses de pression de surface en fonction du temps normalisé $\Pi = f(\alpha_\Pi t)$. Le maximum d'élasticité est plus élevé et apparaît à une pression de surface plus grande pour l'isolat de tournesol ($E' = 57$ mN/m à $\Pi = 19$ mN/m) que pour l'isolat de

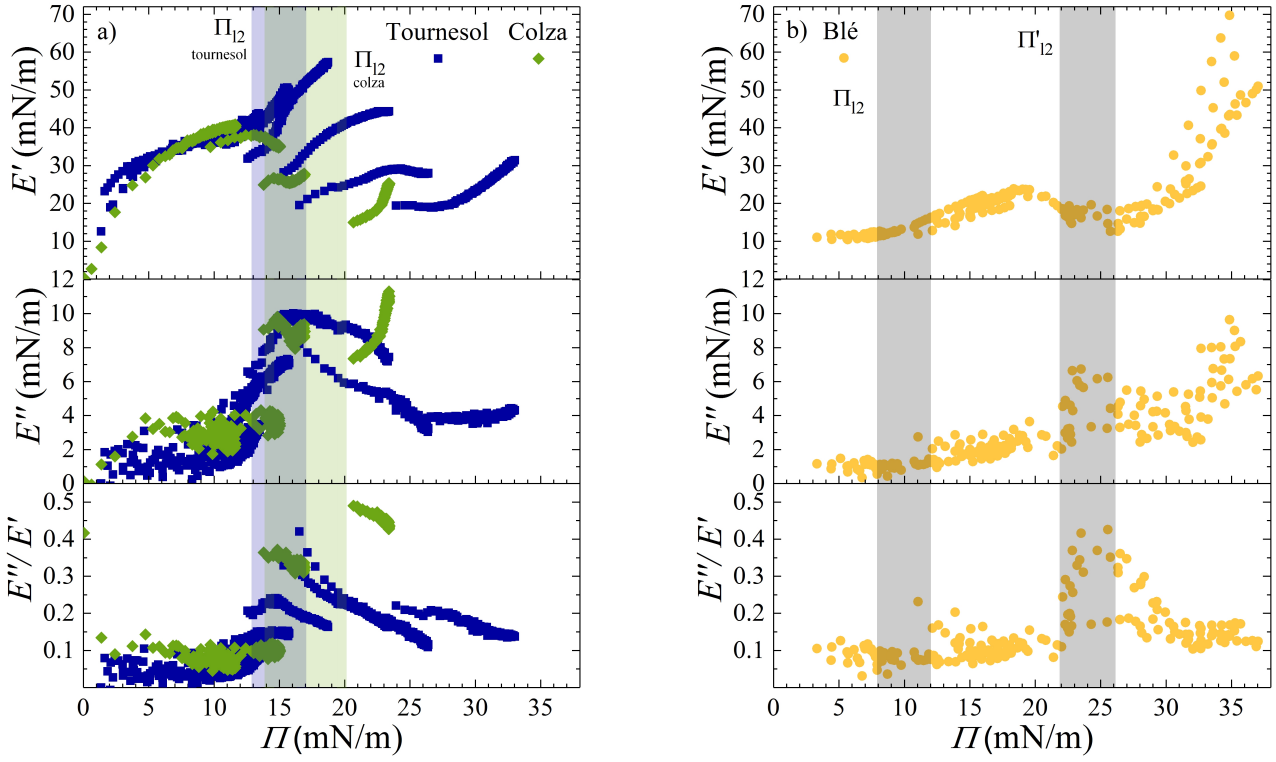


Fig. 6.3: Modules élastiques E', visqueux E'' et facteur de perte $\frac{E''}{E'}$ en fonction de la pression de surface, pour les isolats de tournesol (a), de colza (a) et de blé (b). Les bandes verticales représentent un interval de pressions de surface dans lequel une inflexion de la courbe maîtresse $\Pi(\alpha_\Pi t)$ est observée.

colza ($E' = 41$ mN/m à $\Pi = 12$ mN/m). Ce maximum d'élasticité coïncide avec les pseudo-plateaux de pression de surface trouvés dans les courbe $\Pi = f(\alpha_{\Pi} t)$ et au maximum du facteur de perte. Au delà de ces pressions de surface, E' ne suit plus de courbe maîtresse et dépend donc de la concentration en solution. E' est d'autant plus bas que la concentration en solution est grande mais il est croissant pour chaque mesure. Le facteur de perte est de 0.2 pour le tournesol et de 0.5 pour le colza, cela indique un film protéique principalement élastique.
Pour l'isolat de blé (fig. 6.3 (b)), E' forme une courbe maîtresse avec Π, indépendante de la concentration d'isolat en solution sur toute la gamme de Π sondée. E' est d'abord constant avec l'augmentation de pression de surface puis augmente durant une première inflexion de pression de surface remarquée dans les courbes maîtresses $\Pi = f(\alpha t)$. E' jusqu'à un premier maximum ($E' = 24$ mN/m à $\Pi = 19$ mN/m). Après ce maximum l'élasticité diminue et le facteur de perte augmente durant la deuxième inflexion de pression de surface remarquée dans les courbes maîtresses $\Pi = f(\alpha t)$. E' augmente ensuite de manière drastique avec la pression de surface et le facteur de perte devient constant entre 0.1 et 0.2, cela indique un film purement élastique.

Pour ces trois isolats, E' augmente d'abord avec la pression de surface indépendamment du temps et de la concentration d'isolat en solution puis passe par un maximum d'élasticité. Ce maximum de E' coïncide avec une augmentation du facteur de perte et une inflexion de $\Pi(\alpha_{\Pi} t)$ pour le tournesol et le colza, en revanche pour l'isolat de blé, le maximum de E' a lieu pour des pressions de surface plus basses que les pressions de surface liées à l'augmentation du facteur de perte, caractéristique de processus de relaxation. Cette différence a conduit à établir trois régimes pour l'isolat de blé et deux régimes pour les isolats de tournesol et de colza.

Le premier régime, pour les trois isolats, correspond à un film purement élastique où E' est dépendant de la concentration superficielle d'excès uniquement. Ce régime coïncide en pression de surface avec le régime d'adsorption diffusive trouvé par construction des courbes maîtresses $\Pi(\alpha_{\Pi} t)$.
Dans le cas du tournesol et du colza, le deuxième régime correspond au régime de vieillissement. Ce régime est dépendant du temps et de la concentration d'isolat en solution. Le début de ce deuxième régime contient un maximum du facteur de perte, lié aux processus de relaxation. Pour l'isolat de tournesol, ce régime est étudié à temps long (61 h) à l'interface a/e. Le profil optique est modélisable par une une couche peu dense de 130 nm, que l'on attribue à la nucléation d'agrégats à l'interface, qui se décrochent pour diffuser dans le volume. Le décrochage d'agrégats protéiques induit par l'interface est montré pour l'isolat de tournesol aux interface a/e et h/e.
Pour l'isolat de blé, le deuxième régime est toujours indépendant de la concentration en volume et du temps, il dépend donc de la concentration superficielle d'excès uniquement. Le second régime contient le pic du facteur de perte, caractéristique de processus de relaxation. Une évolution anormale de I_1 nous a conduit à formuler l'hypothèse d'une réorientation communes des protéines formant un film optiquement anisotrope.
Le troisième régime est le régime de vieillissement, il correspond à une augmentation drastique de

Tab. 6.4: Facteur y obtenu par ajustements des mesures $\Pi = f(\Gamma)$ et $E' = f(\Pi)$

Isolat protéique	y_2 (à l'interface, 2D)	y_3 (au voisinage de l'interface, 3D)
Tournesol (a/e)	8.0 ($\Pi = 0-3$ mN/m)	3.0 ($\Pi = 12-19$ mN/m)
Tournesol (h/e)	3.7 ($\Pi = 0-5$ mN/m)	2.0 ($\Pi = 19-22$ mN/m)
Colza	6.0 ($\Pi = 0-5$ mN/m)	/
Blé	2.0 ($\Pi = 0-10$ mN/m)	1.2 ($\Pi = 10-19$ mN/m)

Conditions	$y2$	$y3$
Extended chain	2	3/2
Good solvent	3	9/4
θ solvent	8	3
Poor solvent	∞	∞

Fig. 6.4: b) Tableau des exposants théoriques en considérant les interactions du composé adsorbé en 2D (y_2) ou en 3D (y_3), en régime semi dilué. (Image [45])

E'. Les mesures du profil optique effectuées à l'interface a/e indiquent qu'il n'y a pas d'adsorption supplémentaire dans ce troisième régime et que donc le film est monocouche. Pour évaluer l'aspect gélifié ou non du film dans ce troisième régime, des mesures en rhéologie de cisaillement interfacial ont été effectuées avec un bicône mais le module élastique interfacial de cisaillement est trop faible avec cette géométrie. Ce module de cisaillement extrèmement faible est similaire à celui obtenu avec la β-caséine [41].

Par l'obtention du facteur y issu des mesures $E' = y\Pi$ et $\Pi \propto \Gamma^y$ on peut évaluer la nature du solvant pour les protéines à l'interface. La gamme de pression de surface considérée ainsi que les valeurs des facteurs y sont indiqués dans le tableau 6.4. Pour les basses pressions de surface on considère que l'interaction des protéines avec le solvant a lieu à l'interface, en 2D (y_2). Pour des pressions de surface plus élevées on considère l'interaction des protéines adsorbées en 3D (y_3). D'après l'interprétation des valeurs de y (tableau 6.4, [45]). Il apparaît que les protéines de blé à l'interface a/e sont en chaînes étendues à l'interface a/e puis en chaînes étendues 3D, c'est à dire en structure brosse. Cela est en accord avec la structure labile de ces protéines. Pour l'isolat de tournesol à l'interface a/e, d'après la modélisation de y par $E'(\Pi)$ et $\Pi(\Gamma)$, les protéines sont d'abord en solvant θ à l'interface. Pour des pressions de surface plus élevées, les protéines sont en solvant θ sous l'interface, en 3D. A l'interface h/e, les protéines de tournesol sont en bon solvant 2D puis en bon solvant 3D. Cela est cohérent avec une préférence de ces protéines pour l'interface h/e par rapport à l'interface a/e, d'après les temps de latence plus long à l'interface a/e et une pression de surface plateau plus basse. Pour l'isolat de colza, les protéines sont en solvant θ à l'interface 2D.

6.5 Conclusion

On a vu dans les parties précédentes de ce chapitre que les dynamiques d'adsorption et la rhéologie du film interfacial sont limitées par la diffusion des protéines pour la première étape d'adsorption. Le vieillissement du film interfacial est en revanche dépendant de la nature de la protéine et peut donner des comportements très différents comme on a pu le voir pour les isolats de blé et de tournesol. L'étalement des protéines à l'interface diminue significativement avec la saturation du film interfacial uniquement pour l'isolat de blé. Cela est en accord avec la compressibilité des protéines extrapolés par la corrélation décrite précédemment. De plus, l'agrégation sous la monocouche a lieu pour l'isolat de tournesol mais pas pour l'isolat de blé qui forme un film monocouche incompressible. Les mesures d'élasticité dilatationnelle montrent des comportements rhéologiques similaires pour le colza et le tournesol mais tout a fait différents pour l'isolat de blé. Ce comportement en rhéologie dilatationnelle, distinct pour le tournesol et le blé pourrait être une signature de la flexibilité des protéines. D'après la littérature, le premier maximum du module élastique avec la pression de surface atteint par les protéines rigides (l'albumine de sérum bovin $E' = 50 - 60$ mN/m [61], l'ovalbumine $E' = 60$ mN/m [197], la β-Lactoglobuline $E' = 70 - 80$ mN/m [35]) est plus élevé que celui atteint par les protéines plus flexibles (la β-caseine $E' = 25 - 28$ mN/m [198, 199]). Dans notre cas, le premier maximum du module élastique est $E' = 57$ mN/m pour l'isolat de tournesol, $E' = 41$ mN/m pour l'isolat de colza et $E' = 24$ mN/m pour l'isolat de blé. Les valeurs de ces premiers maximum d'élasticité semblent suffisants pour distinguer un comportement plutôt rigide ou flexible. D'après la valeur du premier pic d'élasticité et les calculs d'aires protéique moyens, les protéines de tournesol et de colza étudiées sont caractéristiques d'un comportement plus rigide que les gliadines qui ont un comportement similaire à celui de la β-caséine au niveau de la concentration superficielle d'excès latente (0.5 mg/m^2 pour les gliadines et la β-caséine [189]) et des modules de rhéologie de cisaillement.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans ce manuscrit, les isolats de protéines de réserve de trois végétaux ont été présentés du point de vue de leurs propriétés fonctionnelles en volume et aux interfaces.
En volume, les gliadines de blé ne sont pas connues pour gélifier mais contribuent à une augmentation de la dissipation visqueuse du gluten. L'isolat de tournesol a montré des propriétés gélifiantes. Le gel formé par dénaturation thermique ($> 90°C$) est un gel homogène de nature physique avec des modules élastiques entre 300 et 1000 Pa pour des concentrations entre 100 g/L et 300 g/L. Les interactions non covalentes semblent causer l'élasticité du gel.
A l'interface air/eau, la combinaison des mesures temporelles de pressions de surface, d'élasticité dilatationnelle et d'ellipsométrie a permis d'identifier des évolutions du film interfacial communes aux protéines étudiées et des spécificités propres à chaque protéine. Les gliadines de blé montrent des propriétés interfaciales remarquables avec des quantités minimales de protéines permettant de former un réseau interfacial très basses $\Gamma_{l_1 blé} = 0.5$ mg/m^2 et similaire à celles de la β-caséine [189]. Les deux autres isolats étudiés montrent des quantités minimales de formation du réseau interfacial plus élevées $\Gamma_{l_1 colza} = 1.2$ mg/m^2 et $\Gamma_{l_1 tournesol} = 1.8$ mg/m^2. La spécificité des gliadines vient de leur aptitude à se comprimer à l'interface, jusqu'à une réduction du côté équivalent à l'aire protéique à l'interface d'un facteur 2.5. Le film ainsi formé est un film monocouche, sans agrégation et purement élastique.
Les propriétés interfaciales des isolats de tournesol et de colza sont similaires. Les protéines formant le film interfacial sont faiblement compressibles, jusqu'à une réduction du côté équivalent à l'aire protéique à l'interface d'un facteur 1.3. Le vieillissement du film est lié à une agrégation sous l'interface qui se libére dans le volume, dans le cas du tournesol.

Pour ces trois isolats, l'augmentation de pression de surface jusqu'à saturation du film est guidée par l'adsorption diffusive. Cela a été mis en évidence par une approche originale de construction des courbes maîtresses pour la pression de surface et vérifié par les mesures temporelles de la concentration superficielle d'excès. Cela permet d'établir un premier régime d'adsorption, cinétiquement limité par l'adsorption diffusive. Lorsque le film interfaciale arrive à la saturation monocouche, la pression de surface subie une inflexion temporelle et pendant cette étape, des processus de relaxation du film ont lieu. Ces processus de relaxation liés à une inflexion temporelle de pression de surface sont visibles pour les trois protéines, par l'augmentation du facteur de perte en rhéologie dilatationnelle interfaciale. Après ces processus de relaxation, le vieillissement du film dépend de la nature de la protéine. Pour les gliadines de blé, le film reste sous forme d'une monocouche et devient incom-

pressible. Pour les albumines de colza, le comportement de l'élasticité du film suggère une agrégation sous le film interfacial. Pour l'isolat de tournesol, en plus d'une agrégation sous l'interface, la nucléation d'agrégats induite par l'interface et diffusant dans le volume a lieu.
Comme on a pu le voir dans ce manuscrit, les protéines végétales de réserve offrent des comportements très variés tant en solution qu'à l'interface, comme les protéines animales. Une distinction protéines rigides/flexibles peut être effectuée. Le comportement des gliadines semble similaire à celui de la β-caséine, flexible, alors que le comportement des albumines de colza et de l'isolat de tournesol se rapproche d'avantage du comportement de la β-lactoglobuline plus rigide.

Des corrélations ont été trouvés entre la stabilité d'une mousse formée avec une solution de β-lactoglobulines et l'élasticité dilatationnelle du film protéique à l'interface air/eau [200]. De plus, par des mesures de vitesses de remontée d'une bulle d'air en solution protéique [201], C. Ybert et al. ont montré que les bulles stabilisées par le film protéique à base d'albumines de sérum bovin ont un comportement hydrodynamique comparable à des sphères dures. La relation entre le module d'élasticité dilatationnelle du film et les propriétés moussantes reste à élucider. Par ailleurs, une étude de l'écoulement de gouttes d'huile stabilisées par de la β-caséine et de la β-lactoglobuline, associée à des mesures de cisaillement interfacial, a été effectuée [202]. P. Erni et al. ont montré que les gouttes formées par de la β-lactoglobuline résistent à la déformation et sont modélisables par une capsule molle [203] contrairement aux gouttes recouvertes par de la β-caséine, très déformables comme les gouttes recouvertes par des tensio-actifs moléculaires. L'écoulement interfacial pour un film de β-caséine est supposé similaire à celui de tensio-actifs moléculaires, guidé par les gradients de tension de surface [204]. Ces comportements sont attribués à une structure plus rigide pour la β-lactoglobuline et plus flexible pour la β-caséine.

La texturation d'huiles végétales par formulation stabilisées avec des protéines de ce même végétal est à l'origine de ce projet. Une ouverture possible concernant les émulsions serait d'établir des corrélations entre les propriétés émulsifiantes, la stabilité de l'émulsion et le module d'élasticité interfacial, selon que l'on se trouve dans le régime d'adsorption diffusive, dans le régime de changement de conformation et dans le régime de vieillissement. L'obtention de l'émulsion avec un film interfacial dans l'un des différents régimes peut être contrôlé par la concentration d'isolat en solution a priori.

Annexe

A. CARACTÉRISATION DE L'ISOLAT DE TOURNESOL À 91 %

A.1 Composition en protéines

Le lot 2 a été reçu plus tardivement et il a été caractérisé mais n'a pas fait l'objet d'une étude, c'est pourquoi la caractérisation est mise en annexe. Les mesures par chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide à haute pression (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) sont effectuées par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel, Odile Messieres).

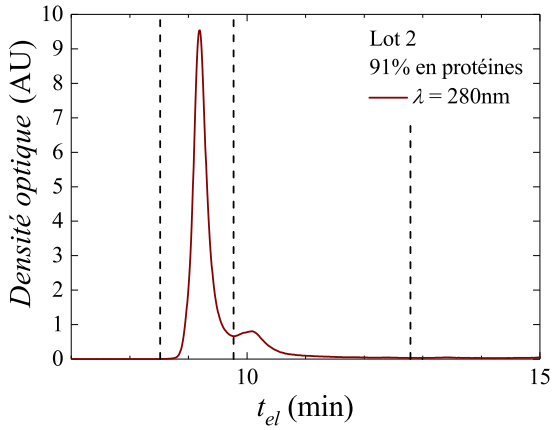


Fig. A.1: Densité optique à 280 nm en fonction du temps d'élution pour le lot 2 (b).

La figure A.1 montre l'HPLC obtenue avec le lot 2. Les traits en pointillés représentent les limites des aires correspondant aux globulines et aux albumines. Par rapport d'aires et connaissant la pureté totale en protéines on peut estimer la proportion en globulines et albumines présentes dans l'isolat. Puisque les deux pics se recouvrent légèrement, les rapports d'aires ne donnent qu'une estimation. L'aire correspondant aux globulines est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 8.52$ min jusque t_{el} =9.77 min et l'aire correspondant aux albumines est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 9.77$ min jusque t_{el} =12.79 min. L'isolat à 91 % est composé à 75 % en globulines et 16 % en albumines.

Afin d'estimer le rapport des composés phénoliques accrochés et libres, une mesure à 325 nm est effectuée. Les composés phénoliques accrochés aux protéines et les composés phénoliques libres n'ont pas exactement le même coefficient d'extinction molaire. De plus, le coefficient d'extinction molaire obtenu varie selon la méthode utilisée [172, 177]. le résultat des rapports d'aires est donc une simple estimation puisque nous considérons un coefficient d'extinction molaire constant pour les

composés phénoliques accrochés et libres. La figure A.2 montre l'HPLC obtenue avec le lot 2.Les

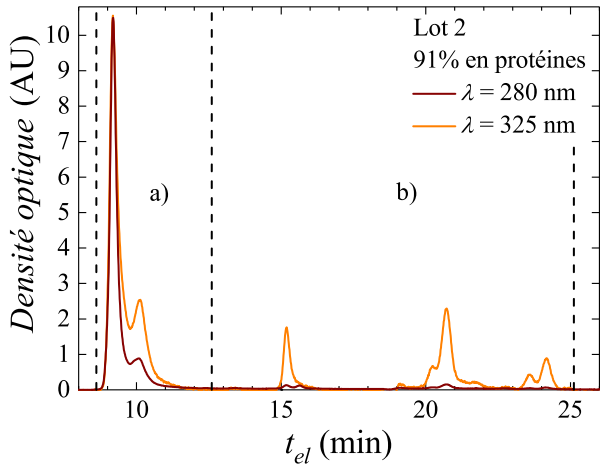


Fig. A.2: Densité optique à 280 et 325 nm en fonction du temps d'élution.

pics de la zone (a) correspondent aux composés phénoliques accrochés aux protéines car ils ont les même temps d'élution que les pics mesurés à $\lambda = 280$ nm, sensible aux tryptophanes des protéines. Les pics de la zone (b) correspondent aux composés phénoliques libres. L'aire correspondant aux composés phénoliques accrochés est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 8.61$ min jusque $t_{el} = 12.60$ min et l'aire correspondant aux composés phénoliques libres est considérée sous la courbe aux temps d'élutions $t_{el} = 12.60$ min jusque $t_{el} = 25.12$ min. Le lot 2 est composé à 70 % en composés phénoliques accrochés et 30 % en composés phénoliques libres.

A.2 Solubilité de l'isolat

La solubilité de l'isolat de tournesol à 91% en fonction du pH est déterminée au LRGP par des mesures de chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC). L'isolat est dispersé dans l'eau osmosée à 5g/L. L'ajustement en pH est fait par ajouts de petits volumes d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium concentré. La solution est agitée 20 min puis filtrée et mise dans l'éluant. La solubilité en fonction du pH est également déterminée par spectrométrie-UV (fig. A.3). Pour la mesure par spectrométrie-UV, les mesures sont effectuées dans des solutions tampons de force ionique 0.1 M aux pH 3 (tampon acétate), 5 (tampon citrate), 7 (tampon phosphate), 10 (tampon carbonate).

La figure A.3 montre l'absorbance du lot 2 à différents pH. Le trait vertical en pointillés symbolise la longueur d'onde 280 nm à laquelle l'absorbance est considérée pour calculer la solubilité. La solubilité obtenue est la même pour les deux protocoles excepté pour la solution tampon citrate à pH 3, qui semble réduire d'avantage la solubilité qu'une solution acide chlorhydrique au même pH. L'acide citrique étant un poly-anions, il a pu complexer une partie des protéines.

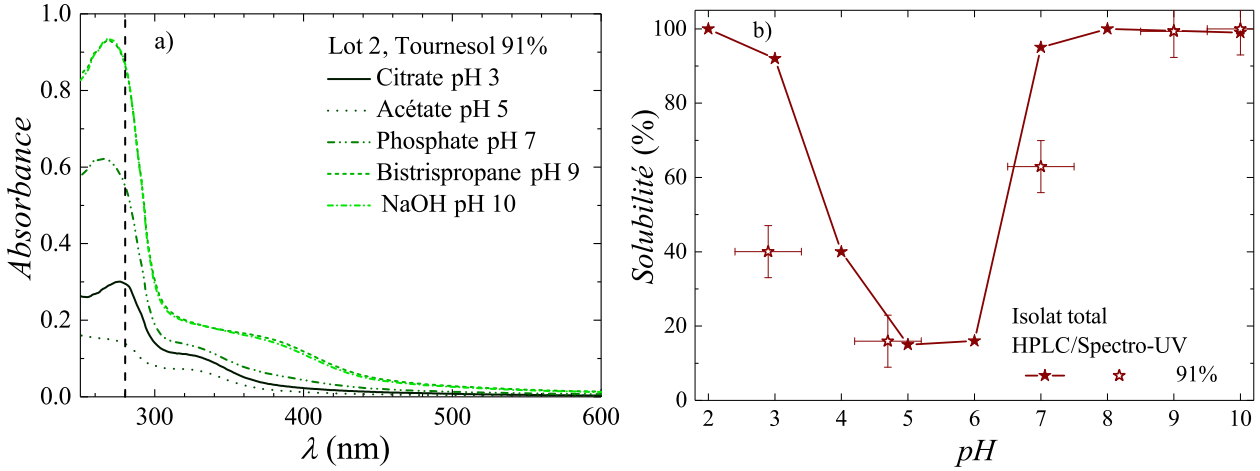


Fig. A.3: a)Absorbance en fonction de la longueur d'onde de solution du lot 2 à différents pH ($I = 0.1$ M).
b) Solubilité en fonction du pH, avec le lot 2 (pureté 91 %), par HPLC et spectrométrie-UV.

A.3 Rayons hydrodynamiques

Les rayons hydrodynamiques du lot 2 en solution sont évalués en utilisant les coefficients de diffusion obtenus par diffusion dynamique de la lumière (DLS, section 2.1.3). Une solution protéique à 5 g/L d'isolat (lot 2, 91 %) préparée dans un solvant d'hydroxyde de sodium à 0.1 mM (pH 10.0) est utilisée.

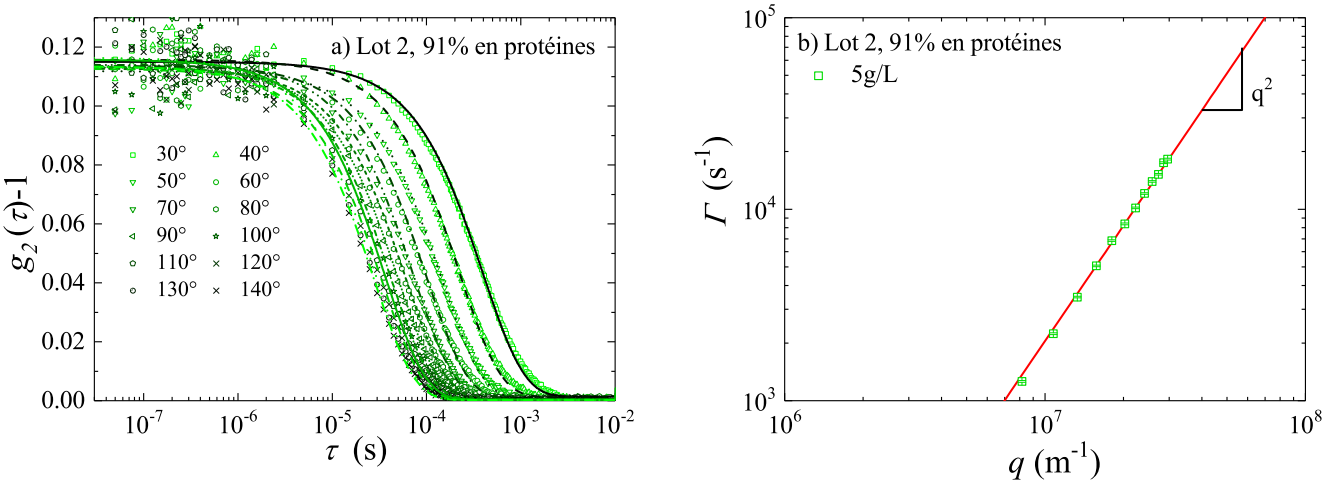


Fig. A.4: a) Fonction d'auto-corrélation en fonction du temps de retard, ajustée par mono exponentielle, avec l'isolat à 91 % pour une solution à 5g/L.
b) Taux de décroissances Γ en fonction du vecteur d'onde q pour une solution préparée avec le lot 2.

La figure A.4 (a) montre les fonctions d'autocorrélation à différents angles, ajustées par une exponentielle simple (eq. 2.13). L'incertitude relative sur les taux de décroissance obtenus est de 1 %. La modélisation d'une seule taille monodisperse suffit à ajuster nos mesures. On peut donc considérer que la solution à 5 g/L du lot 2 contient une seule taille avec une polydispersité très faible (< 0.02 par

l'analyse des cumulants). La figure A.4 (b) montre les taux de décroissance obtenus par les ajustements précédents (fig. A.4) en fonction du vecteur de diffusion q par une loi de puissance d'exposant 2, signature de processus diffusifs responsables des fluctuations d'intensité. Le préfacteur de la loi de puissance correspond au coefficient de diffusion, $D = 20.5 \pm 0.5\ \mu m^2/s$. Le rayon hydrodynamique associé au coefficient de diffusion est $R_H = 10 \pm 1$ nm. Ce rayon hydrodynamique correspond à la dimension maximale de la globuline hexamérique d'après la littérature [97] et a également été obtenue par d'autres expérimentateurs [84].

A.4 Température de dénaturation

Les globulines de tournesol sont connues pour avoir des températures de dissociation dépendantes du pH et de la force ionique de la solution. Comme les globulines d'autres végétaux [90], les hexamères de globulines peuvent se dissocier en trimère ou monomère. Il faut donc dfférencier la température de dénaturation qui correspond à la perte de structure secondaire et la température de dissociation qui correspond à la perte de structure quaternaire. D'après la littérature [81], l'héxamère de globuline se dissocie en monomères dénaturés autour de 90°C et le trimère se dissocie en monomères non dénaturés autour de 60°C [93]. Les albumines de tournesol ont une température de dénaturation proche de 110°C.

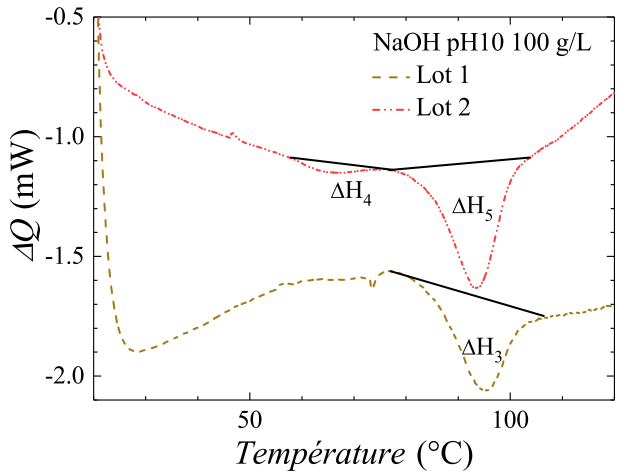


Fig. A.5: Variation du flux de chaleur ΔQ en fonction de la température. Les solutions sont préparées à 100 g/L avec le lot 1 (pureté 85 %, traits en pointillés) et le lot 2 (pureté 91 %, traits hachurés).

La figure A.5 permet de comparer les proportions des formes trimériques et hexamériques dans les solutions d'isolat protéique à 100 g/L préparés avec les lots 1 et 2 dans un solvant d'hydroxyde de sodium dilué à pH 10 (I = 0.1 mM). Pour le lot 1, on observe un pic endothermique avec un minimum à 95°C. pour le lot 2, deux pics endothermiques sont visibles, un leger pic avec un minimum à 67.1°C et un pic plus abrupt avec un minimum à 94°C. On observe que pour le lot 2 la dénaturation du trimère en monomère est visible ($\Delta H_4 = 0.6$ J/g de protéines), contrairement au lot 1. Le pic de

dissociation de l'hexamère obtenu avec le lot 2 est plus abrupt que celui issu du lot 1, avec une aire plus grande ($\Delta H_5 = 7.5$ J/g de protéines pour le lot 2 et $\Delta H_3 = 6.4$ J/g de protéines pour le lot 1).

Bien que les deux lots de tournesol aint été effectués avec le même protocole de purification, le lot 2, plus pur, contient également une seul population extrèmement peu polydisperse. D'après les mesures de microcalorimétrie le lot 2 semble également contenir plus de protéines non dénaturés.

B. RHÉOLOGIE DU FILM PROTÉIQUE AVEC ÉCHANGE DE VOLUME À DIFFÉRENTS PH

Afin de déterminer l'impact du pH du solvant sur les propriétés interfaciales on utilise le capillaire coaxial pour effectuer les mesures de goutte pendante oscillante et le lavage de goutte. Le protocole de mesure de la viscoélasticité dilatationnelle est effectuée de la même manière que pour les mesures précédentes (fig. 2.20). Entre ces mesures des modules élastiques et visqueux, le lavage de la goutte est effectué avec le même protocole que celui établi précédemment 2.1.6.3. La solution protéique est initialement préparée dans une solution d'hydroxyde de sodium diluée à pH 10. Une mesure des modules élastiques et visqueux est effectuée 600 s après que la goutte soit formée dans l'hexadecane ($\frac{\Delta A}{A} = 5\%$, $f = 0.1$ Hz). Un lavage (trente fois le volume de la goutte) est ensuite effectué avec le solvant désiré (eau milliQ (pH $6-7$), tampon acétique (pH=5.5, I=0.1M) acide acétique à 50 mM (pH 3)) comme le montre la figure B.1.

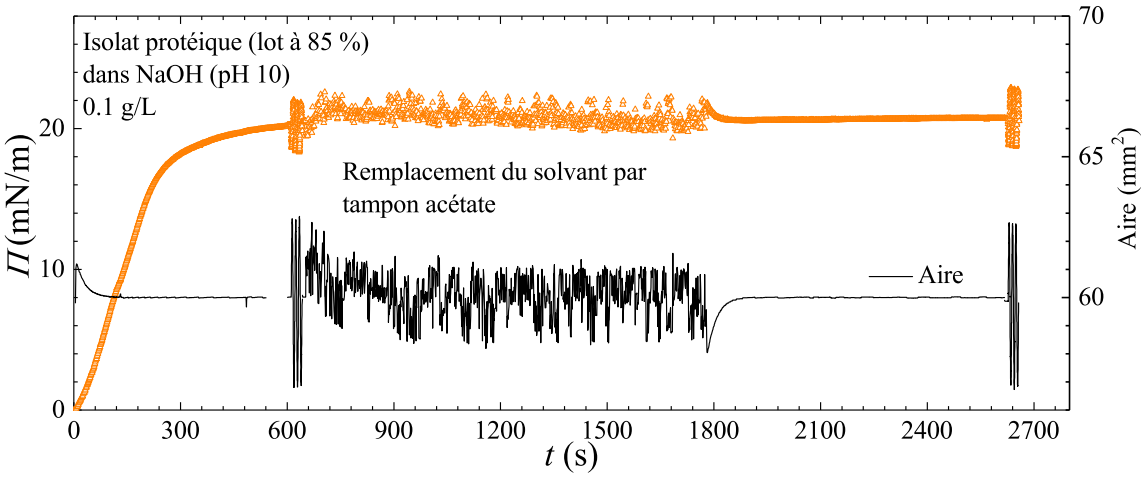


Fig. B.1: Pression de surface (triangle vides) et aire de surface (ligne) en fonction du temps à l'interface hexadecane/eau pour solution d'isolat protéique à 0.1 g/L lavée par une solution tampon acétique (pH 5.5, I=0.1M).

Le trait plein représente l'aire de la goutte avec le temps, les triangles vides représentent la pression de surface avec le temps d'une solution d'isolat protéique à 0.1 g/L. Les mesures des modules élastiques et visqueux avant et après lavages sont montrés en fonction de la pression de surface à la figure B.2. On rapporte également les mesures des modules élastiques et visqueux effectués avec une solution de même concentration à la même interface, sans lavage, afin d'évaluer l'incertitude de mesure.
On observe que les modules élastiques et visqueux varient peu avant et après le lavage de la goutte

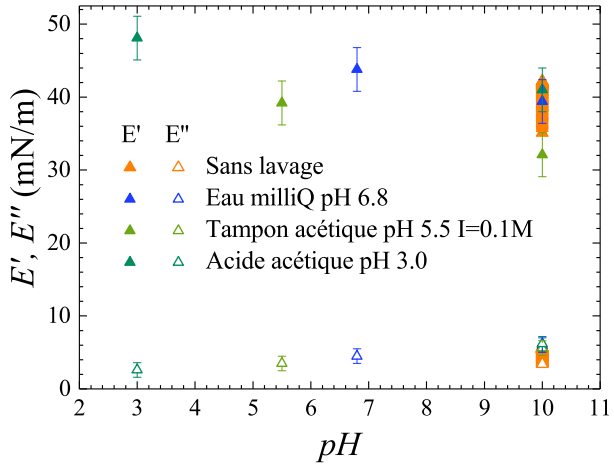


Fig. B.2: Modules élastiques et visqueux en fonction du pH de la solution dans le volume de la goutte.

pour tous les solvants de lavage. Une variation des modules élastiques après lavage à l'acide acétique (pH 3) est visible au delà des incertitudes de mesures. Le film est plus élastique de 8±6 mN/m. On peut supposer que l'abaissement à ce pH contribue à la formation d'interactions électrostatiques ou de Van der Waals rendant le film légèrement plus élastique que sans le lavage. D'une manière générale, l'élasticité du film, initialement formé à pH 10, semble très peu dépendant du pH de la solution en volume. Cela indique que la viscoélasticité du film formé à l'interface hexadécane/eau est peu sensible au pH de la solution aqueuse. On rappelle que l'isolat de tournesol est très soluble à pH 10 et a son creux de solubilité à pH 5, ce qui correspond au point iso-électrique des globulines de tournesol.

C. INFLUENCES DE LA PURETÉ DE L'ISOLAT DE COLZA

Deux lots d'isolat de colza ont été fournis par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Romain Kapel et Mélody Basselin). Les deux lots contiennent respectivement 72 % (lot 1) et quasiment 100 % (lot 2) d'albumines de colza. Dans le lot 1, les 28 % restant sont composés d'acide phytique ($10-15$ %), de cellulose ($5-10$ %) et de composés phénoliques ($5-10$ %). Les mesures par chromatographie sont effectuées au LRGP et uniquement les résultats du lot 1 sont diponibles. Ces résultats révèlent que 75 % des composés phénoliques, présents dans le lot 1, sont accrochés aux protéines (fig. 2.28).
De plus, pour une solution protéique à 10 g/L préparée avec le lot 1, les mesures de diffusion dynamique de la lumière sont modélisables par des rayons hydrodynamiques $R_{H,rapide} = 8 \pm 3$ nm et $R_{H,lent} = 80 \pm 10$ nm alors que pour le lot 2, les mesures ne sont modélisables que par un seul rayon hydrodynamique, $R_H = 2.6 \pm 0.5$ nm. Les résultats du lot 2 sont en accord avec la litterature [109] qui trouve une population de 2 nm pour un isolat d'albumines de colza pur. Dans le lot 1, la population à 80 ± 10 nm correspond probablement à un assemblage de protéines pontées par de l'acide phytique et des composés phénoliques.

L'acide phytique (nom chimique : inositol hexaphosphate) est d'autant plus chargé négativement que le pH de la solution est basique. Il est connu pour complexer avec tous les composés chargés positivement comme les minéraux cationiques et les acides aminés chargés positivement comme l'arginine et la lysine dans l'eau [70, 115]. D'après la littérature, par chromatographie d'exclusion stérique (colonne de séphadex G-75) calibrée avec des composés de masses molaires standards, R. Mothes et al. [205] ont mesuré les temps d'élution de solutions d'albumines de colza dans un solvant tampon Tris à pH 8 et $I = 0.05$ M, avec et sans acide phytique. Les temps d'élution correspondent à des masses molaires de 14 kDa pour les albumines sans acide phytique et 26.5 kDa en présence d'acide phytique. De plus, l'acide phytique est détecté à une longueur d'onde de 475 nm en plus de la détection des protéines à 280 nm. ces détections montrent qu'une partie de l'acide phytique sort au mêmes temps d'élutions que les protéines. Ces résultats montrent la complexation d'albumines en présence d'acide phytique.

Le principal composé phénolique dans l'isolat protéique de colza est l'acide sinapique (fig. 1.29). Il peut réagir avec les zones des protéines chargées positivement et participer à la formation d'assemblages protéiques. Une étude a montré qu'en présence du principal composé phénolique de l'isolat de tournesol, l'acide chlorogénique (fig. 1.22) produit des assemblages supérieurs à 100 nm [84]. Toute-

fois l'acide chlorogénique n'est pas tensioactif, lorsqu'il est à 0.1 % w/w dans une soution aqueuse, la tension de surface à l'interface air/eau au bout de 10 000 s est abaissée de 5 mN/m, alors qu'elle est abaissée de 17 mN/m pour 0.1 % de protéines de tournesol dans l'eau [84].

C.1 Temps de latence

Les mesures de temps de latence sont effectuées de la même manière qu'au chapitre précédent (fig. 5.2), par la méthode des tangentes (fig. C.1).

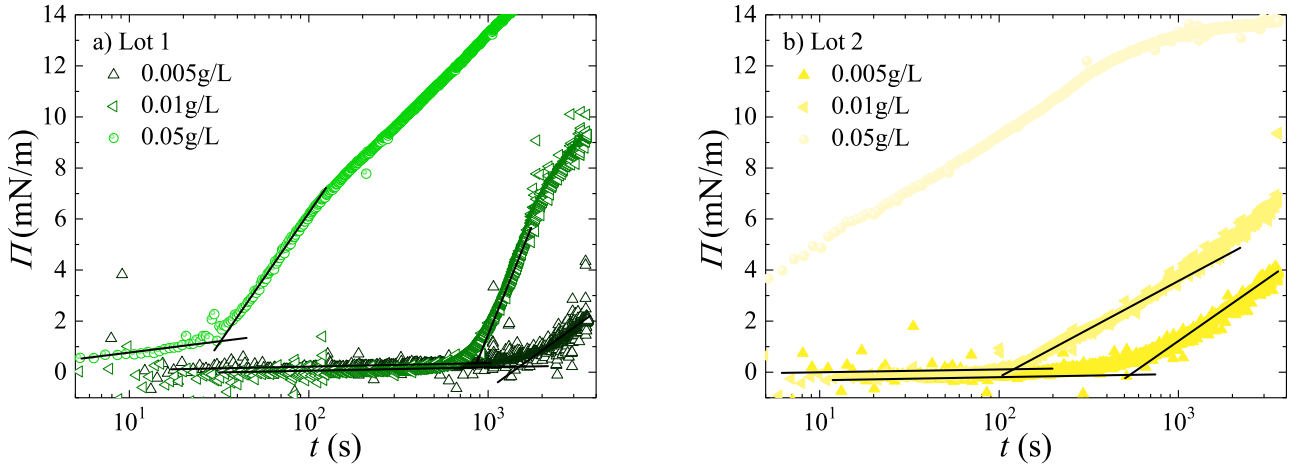


Fig. C.1: Pression de surface en fonction du temps à l'interface a/e pour le lot 1 (a) et 2 (b) en albumines de colza. L'intersection des tangentes correspond au temps de latence t_{l_1}.

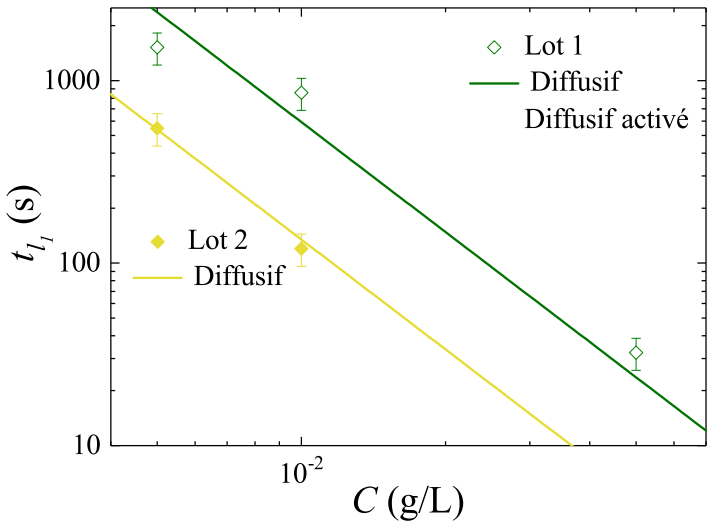


Fig. C.2: Temps de latence t_{l_1} en fonction de la concentration, à l'interface a/e pour le lot 1 (losanges vides) et 2 (losanges pleins). Les lignes claires correspondent au modèle diffusif et la ligne foncée correspond au modèle diffusif activé.

La figure C.2 montre l'évolution des temps de latence avec la concentration en isolat protéique à l'interface a/e pour le lot 1 et 2 en protéines de colza. L'incertitude relative est de 20 % (chapitre précédent fig. 5.2). Les temps de latence diminuent avec la concentration d'isolat protéique en solution pour les deux lots. Pour une même concentration d'isolat protéique en solution, le temps de latence est plus grand pour le lot 1.

Pour le lot 2, la modélisation des temps de latence a été faite avec le modèle diffusif (eq. 5.5) où la concentration superficielle d'excès latente au delà de laquelle la pression de surface augmente, Γ_{l_1}, est un paramètre libre. Le meilleur ajustement correspond à $\Gamma_{l_1} = 1.2 \pm 0.2$ mg/m^2 (ligne jaune fig. C.2). Cela est dans l'ordre de grandeur de ce qui à été trouvé dans la littérature pour l'albumine de colza ($\Gamma_{l_1,exp} \simeq 1$ mg/m^2 fig. 1.32 [127]). La prédiction diffusive des temps de latence apparait donc pertinente. Pour le lot 1, en prenant le coefficient de diffusion de la population rapide du lot 1, le meilleur ajustement correspond à $\Gamma_{l_1} = 1.4 \pm 0.2$ mg/m^2 (ligne verte fig. C.2).

C.2 Courbes maîtresses de pression de surface

Les mesures de pression de surface et de viscoélasticité interfaciale sont effectuées pour les lots 1 (72 % de protéines) en 2 (100 % de protéines). La construction des courbes maîtresses de pression de surface obtenue avec les facteurs d'échelles α_Π est effectuée de la même manière que dans le chapitre précédent (section 5.1.3) avec comme concentration de référence 0.1 g/L.

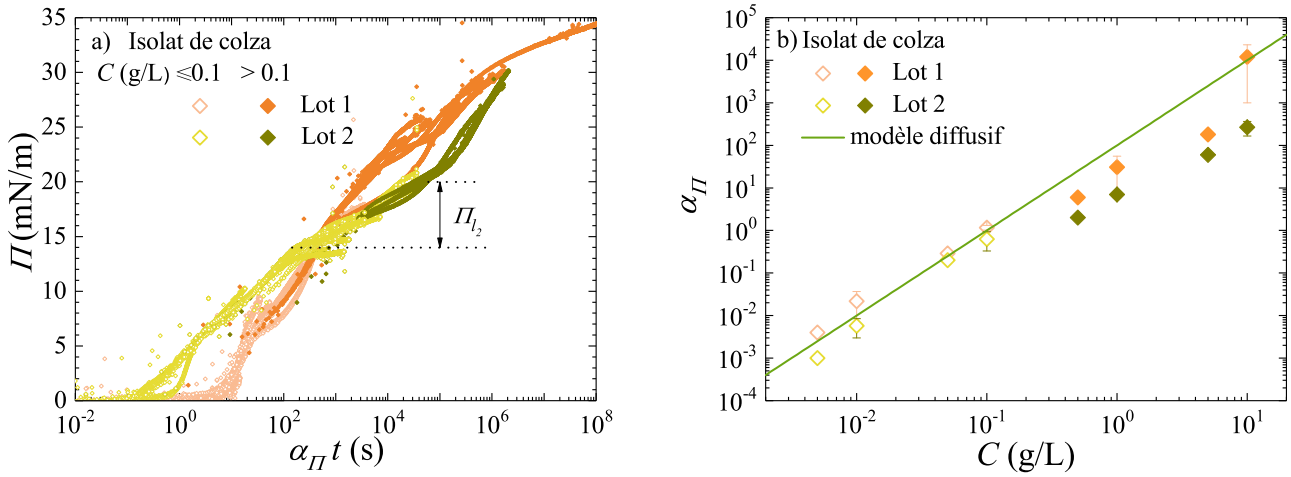


Fig. C.3: a) Pression de surface en fonction du temps normalisé par le facteur d'échelle α_Π. Π_{l_2} correspond au pseudo-plateau de pression de surface du lot 2.
b) Facteur d'échelle α_Π en fonction de la concentration C. Le trait plein correspond à un modèle purement diffusif sans paramètre libre (eq. 5.9)

La figure C.3 (a) montre les courbes maîtresses obtenues pour les deux lots. La courbe maîtresse obtenue pour le lot 2 est de meilleur qualité que celle obtenue avec le lot 1. Les deux couleurs pour chaque courbe maîtresse permettent d'observer les courbes obtenues avec une concentration d'isolat

protéique en solution inférieure ou égale à 0.1 g/L (losanges vides) et supérieure à 0.1 g/L (losanges pleins). Pour les deux courbes maîtresses, on observe des temps de latence t_{l_1}, plus long pour le lot 1 puis une augmentation temporelle de pression de surface plus forte pour lot 1 que pour le lot 2. La courbe maîtresse obtenue avec le lot 2 présente un pseudo-plateau, signalé par un intervalle de pression de surface à $\Pi_{l_2} = 17 \pm 3$ mN/m. Pour la plus forte concentration utilisée (10 g/L) au bout de 1 h, la pression de surface est plus élevée avec le lot 1 ($\Pi = 35$ mN/m) qu'avec le lot 2 où $\Pi = 30$ mN/m.

La figure C.3 (b) montre les facteurs d'échelle correspondant aux courbes maîtresses en fonction de la concentration en isolat protéique pour les lots 1 (symboles orange) et 2 (symboles verts). Le trait correspond à un modèle diffusif sans paramètre libre. Les facteurs d'échelle suivent le modèle diffusif jusqu'à la concentration d'isolat protéique en solution $C = 0.1$ g/L, indépendamment de la pureté en protéines.

C.3 Courbes maîtresses de viscoélasticité dilatationnelle

Les mesures des modules élastique et visqueux interfaciaux en rhéologie de compression ont été effectuées par la méthode de la goutte pendante oscillante (section 2.1.6.2). La figure C.4 montre

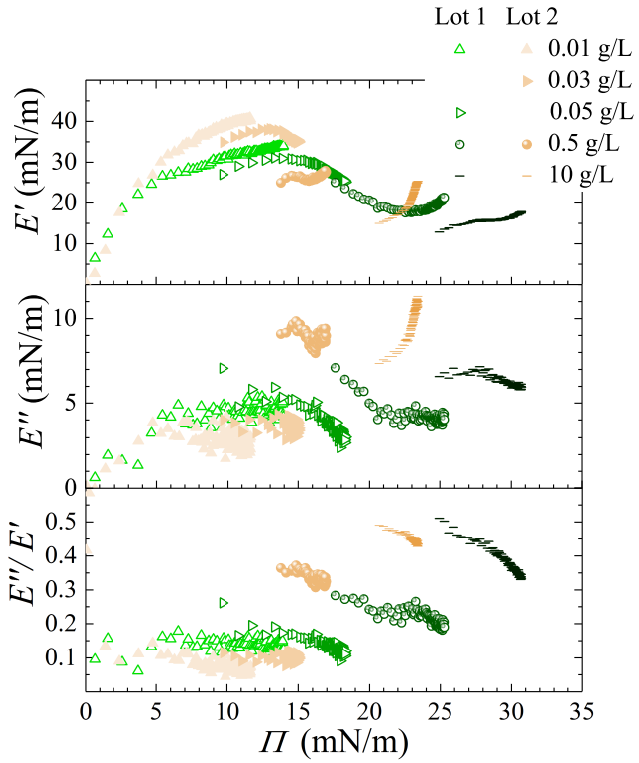


Fig. C.4: Modules élastiques E' et visqueux E'', facteur de perte $\frac{E''}{E'}$ à l'interface air/eau, pour les lots 1 et 2.

les modules élastique E', visqueux E'' et le facteur de perte $\frac{E''}{E'}$ à l'interface air/eau, pour les isolats de colza du lot 1 (72 % en protéines, symboles vides) et 2 (100 % en protéines, symboles pleins).

La première augmentation des modules élastiques et visqueux en fonction de la pression de surface est identique pour les deux lots. Le maximum du module élastique est légèrement plus élevé pour le lot 2. Après ce maximum, les modules E' et E'' sont de plus en plus bas avec la concentration et ne forment plus de courbe maîtresse avec la pression de surface, pour les deux lots. Les évolutions de E' et E'' avec la pressions de surface sont similaires à ce qui a été observé pour l'isolat de tournesol, cependant aucune turbidité en solution n'a été observée pour les solutions de colza les plus concentrés, contrairement aux solutions d'isolat de tournesol. L'adsorption monocouche est similaire pour les deux lots jusqu'à 5 mN/m, puisque le module élastique devient ensuite plus bas en présence d'impuretés, cela suggère que les interactions entre albumines avec impuretés semblent plus faibles que pour le lot 2.

C.4 Conclusion

Les temps de latences mesurés pour les deux lots indiquent que l'adsorption suit le modèle diffusif, avec une légère barrière d'adsorption pour le lot 1 qui contient de l'acide phytique et des composés phénoliques dans des proportions inconnues. Ces temps de latences sont plus courts pour le lot 2, en accord avec un coefficient de diffusion de la population rapide plus élevé que pour le lot 1. Le lot 1 contient de l'acide phytique et en plus d'une population moins rapide que le lot 2, la présence d'assemblages ($R_{H,lent} = 80 \pm 10$ nm) est détectée.
La construction des courbes maîtresses est possible pour les deux lots avec un meilleur recouvrement pour le lot 2. Une inflexion temporelle de la pression de surface est visible uniquement pour le lot 2. Cependant, malgré les différences observées pour ces deux lots, les facteurs d'échelle utilisés suivent tous deux le modèle diffusif pour des courbes obtenues avec des solutions de concentration inférieures ou égale à 0.1 g/L. La mesure des modules élastiques et visqueux est similaire pour les deux lots avec un recouvrement des courbes maîtresses jusque $\Pi = 5$ mN/m. L'évolution de E' et E'' avec la pression de surface est de la même forme que pour l'isolat de tournesol.
Ces résultats montrent que la pureté de l'isolat agit sur la diffusion des composés en solution et la formation d'assemblage est favorisée par les impuretés, notamment l'acide phytique et les composés phénoliques. La présence d'une barrière à l'adsorption due aux impuretés n'est pas exclus. De plus, les impuretés semblent réduire les interactions des protéines à l'interface, limitant ainsi la valeur du module élastique. Toutefois, l'évolution des temps de latence et des facteurs d'échelles avec la concentration suivent le modèle diffusif pour les deux isolats jusqu'à une concentration en solution de 0.1 g/L. La pression de surface maximale est plus élevée en présence d'impuretés, cela indique que les impuretés permettent un meilleur recouvrement interfacial des protéines à l'interface.

Bibliographie

[1] M. Dabbour, R. He, H. Ma, and A. Musa, "Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 41, no. 5, p. e12799, Aug. 2018.

[2] O. Adeyi, D. I. O. Ikhu-Omoregbe, and V. A. Jideani, "Rheological properties of sunflower oil-in-water emulsion containing vinegar, stabilized with gelatinized bambara groundnut flour," *International Journal of Engineering Research in Africa*, vol. 36, pp. 85–97, 8 2018.

[3] A. Sanchez and J. Burgos, "Gelation of sunflower globulins hydrolysates : Rheological and calorimetric studies," *Agriculture and food chemistry*, pp. 2407 – 2412, 1997.

[4] M. A. Malik and C. S. Saini, "Rheological and structural properties of protein isolates extracted from dephenolized sunflower meal : Effect of high intensity ultrasound," *Food Hydrocolloids*, vol. 81, pp. 229–241, Aug. 2018.

[5] R. Uauy, A. Aro, R. Clarke, Ghafoorunissa, M. R. L'Abbé, D. Mozaffarian, C. M. Skeaff, S. Stender, and M. Tavella, "WHO Scientific Update on trans fatty acids : summary and conclusions," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 63, no. S2, pp. S68–S75, May 2009.

[6] H. Neurath and H. B. Bull, "The Surface Activity of Proteins." *Chemical Reviews*, vol. 23, no. 3, pp. 391–435, Dec. 1938.

[7] W. Norde and J. Lyklema, "Why proteins prefer interfaces," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 2, no. 3, pp. 183–202, Jan. 1991.

[8] J. L. Brash and T. A. Horbett, "Proteins at Interfaces : An Overview," in *Proteins at Interfaces II*, T. A. Horbett and J. L. Brash, Eds. Washington, DC : American Chemical Society, May 1995, vol. 602, pp. 1–23.

[9] C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. I. Leavesley, and M. J. Pearcy, "Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins : A Review," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 1-2, pp. 1–18, Jan. 2005.

[10] D. Ramiandrisoa, "Adsorption de protéines sur des colloïdes et agrégation induite," Ph.D. dissertation, Université Pierre et Marie Curie, 2014.

[11] A. Nesterenko, "Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation," Ph.D. dissertation, Université de Toulouse, 2013.

[12] I. Gitlin, J. Carbeckand, and G. M. Whitesides, "Why are proteins charged ?" *Angew. Chem. Int.*, vol. 45, pp. 3022–3060, 2006.

[13] J. Benjamins, "Static and dynamic properties of proteins adsorbed at liquid interfaces," Ph.D. dissertation, s.n.], Université de Wageningen, 2000.

[14] T. Osborne, "The vegetable proteins," *Journal of the society f chemical industry banner*, 1924.

[15] D. Salunkhe, J. Chavan, R. Adsule, and S. Kadam, *World oilseeds, Chemistry, Technology and Utilization*, L. of Congress, Ed. Van Nostrand Rainhold, 1992.

[16] J. W. Gibbs, *The collected works of J.W Gibbs*, Longmans, Ed. Green, New York, 1931, vol. 1, no. 219.

[17] S. Arditty, "Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales," Ph.D. dissertation, Université de Bordeaux I, 2004.

[18] N. Mucic, A. Javadi, M. Karbaschi, A. Sharipova, V. B. Fainerman, E. V. Aksenenko, N. M. Kovalchuk, and R. Miller, "Surfactant Adsorption Kinetics," in *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, T. Tadros, Ed. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 1090–1126.

[19] I. Langmuir and D. F. Waugh, "The adsorption of proteins at oil-water interfaces and artificial protein-lipoid membranes," *Journal of general physiology*, vol. 21, no. 6, pp. 745–755, 1938.

[20] I. Langmuir, "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part I," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 38, no. 11, pp. 2221–2295, Nov. 1916.

[21] J. Eastoe and J. S. Dalton, "Dynamic surface tensioon and adsorption mechanisms of surfactants at air-water interface," *Advances Colloid and Interface Science*, 2000.

[22] T. Miura and K. Seki, "Diffusion Influenced Adsorption Kinetics," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 34, pp. 10 954–10 961, Aug. 2015.

[23] I. Langmuir and V. J. Schaefer, "The Effect of Dissolved Salts on Insoluble Monolayers," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 59, no. 11, p. 2406, Nov. 1937.

[24] F. MacRitchie and A. E. Alexander, "Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part I. The role of bulk diffusion in adsorption," *Journal of Colloid Science*, vol. 18, no. 5, pp. 453–457, 1963.

[25] F. Ravera, L. Liggieri, and A. Steinchen, "Sorption kinetics considered as a renormalized diffusion process," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 156, no. 1, pp. 109 – 116, 1993.

[26] C. Ybert and J. M. di Meglio, "Study of protein adsorption by dynamic surface tension measurements : Diffusive regime," *Langmuir*, 1998.

[27] H. A. Dieu and H. B. Bull, "Monolayers of Pepsin and of Insulin," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 71, no. 2, pp. 450–452, Feb. 1949.

[28] H. B. Bull, "Determination of molecular weights of proteins in spread monolayers," *Journal of biological chemistry*, vol. 185, pp. 27–38, Jul 1950.

[29] V. Fainerman, E. Lucassen-Reynders, and R. Miller, "Description of the adsorption behaviour of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 106, no. 1-3, pp. 237–259, Dec. 2003.

[30] V. B. Fainerman, V. I. Kovalchuk, E. V. Aksenenko, I. I. Zinkovych, A. V. Makievski, M. V. Nikolenko, and R. Miller, "Dilational Viscoelasticity of Proteins Solutions in Dynamic Conditions," *Langmuir*, vol. 34, no. 23, pp. 6678–6686, Jun. 2018.

[31] B. Noskov and A. Mikhailovskaya, "Adsorption kinetics of globular proteins and protein/surfactant complexes at the liquid–gas interface," *Soft Matter*, vol. 9, no. 39, p. 9392, 2013.

[32] F. MacRitchie and A. E. Alexander, "Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part III. The role of electrical barriers in adsorption," *Journal of Colloid Science*, vol. 18, no. 5, pp. 464–469, 1963.

[33] J. M. G. Lankveld and J. Lyklema, "Adsorption of polyvinyl alcohol on the paraffin—water interface. I. Interfacial tension as a function of time and concentration," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 41, no. 3, pp. 454 – 465, 1972.

[34] K. Hamaguchi, "Studies on proteins denaturation by surface chemical method," *The Journal of Biochemistry*, vol. 42, no. 5, pp. 449–459, 1955.

[35] E. Lucassen-Reynders, J. Benjamins, and V. Fainerman, "Dilational rheology of protein films adsorbed at fluid interfaces," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 15, no. 4, pp. 264–270, Aug. 2010.

[36] A. Banc, B. Desbat, D. Renard, Y. Popineau, C. Mangavel, and L. Navailles, "Structure and orientation changes of w-and y-gliadins at the air- water interface : A PM- IRRAS spectroscopy and Brewster angle microscopy study," *Langmuir*, vol. 23, no. 26, pp. 13 066–13 075, 2007.

[37] Langmuir, "Morphological chnages in adsorbedprotein films at the oil-water interface subjected to compression, expension and heat processing," *Xu, Rong and Dickinson, Eric and Murray, Brent S.*, vol. 24, no. 5, pp. 1979–1988, Mar. 2008.

[38] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, "Driving Force Behind Adsorption-Induced Protein Unfolding : A Time-Resolved X-ray Reflectivity Study on Lysozyme Adsorbed at an Air/Water Interface," *Langmuir*, vol. 25, no. 1, pp. 32–35, Jan. 2009.

[39] C. J. Beverung, C. J. Radke, and H. W. Blanch, "Protein adsorption at the oil/water interface : characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements," *Biophysical Chemistry*, p. 22, 1999.

[40] S. Pezennec, "The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air–water interface," *Food Hydrocolloids*, vol. 14, no. 5, pp. 463–472, Sep. 2000.

[41] E. M. Freer, K. S. Yim, G. G. Fuller, and C. J. Radke, "Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface : Comparison of Shear and Dilatation Deformation," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 12, pp. 3835–3844, Mar. 2004.

[42] A. Poirier, A. Banc, A. Stocco, M. In, and L. Ramos, "Multistep building of a soft plant protein film at the air-water interface," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 526, pp. 337–346, Sep. 2018.

[43] V. Aguié-Béghin, E. Leclerc, M. Daoud, and R. Douillard, "Asymmetric Multiblock Copolymers at the Gas–Liquid Interface : Phase Diagram and Surface Pressure," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 214, no. 2, pp. 143–155, Jun. 1999.

[44] R. Douillard, M. Daoud, and V. Aguie-Beghin, "Polymer thermodynamics of adsorbed protein layers," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, p. 7, 2003.

[45] P. Cicuta and I. Hopkinson, "Studies of a weak polyampholyte at the air–buffer interface : The effect of varying *p* H and ionic strength," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 114, no. 19, pp. 8659–8670, May 2001.

[46] S. C. Russev, T. V. Arguirov, and T. D. Gurkov, "b-Casein adsorption kinetics on air–water and oil–water interfaces studied by ellipsometry," *Colloids and surfaces B : Biointerfaces*, p. 12, 2000.

[47] P. Ramírez, A. Stocco, J. Muñoz, and R. Miller, "Interfacial rheology and conformations of triblock copolymers adsorbed onto the water–oil interface," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 378, no. 1, pp. 135–143, Jul. 2012.

[48] A. Banc, B. Desbat, D. Renard, Y. Popineau, C. Mangavel, and L. Navailles, "Structure and orientation changes of ω-and γ-gliadins at the air- water interface : A PM- IRRAS spectroscopy and Brewster angle microscopy study," *Langmuir*, vol. 23, no. 26, pp. 13 066–13 075, 2007.

[49] E. Dickinson, D. S. Horne, J. S. Phipps, and R. M. Richardson, "A neutron reflectivity study of the adsorption of .beta.-casein at fluid interfaces," *Langmuir*, vol. 9, no. 1, pp. 242–248, Jan. 1993.

[50] J. R. Lu, T. J. Su, R. K. Thomas, and J. P. andJ. Webster, "Structural conformation of lysozyme layers at the air-water interface studied by neutron reflection," *J. Chem. Faraday Trans.*, vol. 94, pp. 3279–3287, 1998.

[51] Y. F. Yano, E. Arakawa, W. Voegeli, C. Kamezawa, and T. Matsushita, "Initial Conformation of Adsorbed Proteins at an Air–Water Interface," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 122, no. 17, pp. 4662–4666, May 2018.

[52] K. S. Birdi, "The determination of work of compression of protein monolayers at the air-water interface," *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, vol. 250, no. 3, pp. 222–226, Mar. 1972.

[53] D. E. Graham and M. C. Phillips, "Proteins at liquid interfaces : III molecular structures of adsorbed films," *Journal of colloid and Interface science*, vol. 70, pp. 427–439, jul 1979.

[54] F. Ravera, G. Loglio, and V. I. Kovalchuk, "Interfacial dilational rheology by oscillating bubble/drop methods," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 15, no. 4, pp. 217–228, Aug. 2010.

[55] D. Langevin, "Surface shear rheology of monolayers at the surface of water," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 207, pp. 121 – 130, 2014.

[56] J. Maldonado-Valderrama, V. B. Fainerman, M. J. Galvez-Ruiz, A. Martin-Rodriguez, M. A. Cabrerizo-Vilchez, and R. Miller, "Dilatational rheology of b-casein adsorbed layers at liquid-fluid interfaces," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 37, pp. 17 608–17 616, Sep. 2005.

[57] R. Miller, "Colloids and Interfaces," *Colloids and Interfaces*, vol. 1, no. 1, p. 9, Dec. 2017.

[58] O. Soo-Gun and J. C. Slattery, "Disk and biconical interfacial viscometers," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 67, no. 3, pp. 516–525, Dec. 1978.

[59] F. C. Goodrich, "The Theory of Capillary Excess Viscosities," *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 374, no. 1758, pp. 341–370, Feb. 1981.

[60] C. F. Brooks, G. G. Fuller, C. W. Frank, and C. R. Robertson, "An interfacial stress rheometer to study rheological transitions in monolayers at the air-water interfaces," *Langmuir*, vol. 15, no. 7, pp. 2450–2459, Mar. 1999.

[61] L. G. Cascão Pereira, O. Théodoly, H. W. Blanch, and C. J. Radke, "Dilatational Rheology of BSA Conformers at the Air/Water Interface," *Langmuir*, vol. 19, no. 6, pp. 2349–2356, Mar. 2003.

[62] E. Lucassen-Reynders, "Interfacial Viscoelasticity in Emulsions and Foams," *Food Structure*, 1993.

[63] D. Langevin and F. Monroy, "Marangoni stresses and surface compression rheology of surfactant solutions. Achievements and problems," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 206, pp. 141–149, Apr. 2014.

[64] V. Lesage, "Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen de grain de blé par l'étude de lignées quasi-isogéniques," Ph.D. dissertation, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand), 2011.

[65] J. H. Woychik, J. A. Boundy, and R. J. Dimler, "Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 94, no. 3, pp. 477 – 482, 1961.

[66] R. Urade, N. Sato, and M. Sugiyama, "Gliadins from wheat grain : an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates," *Biophysical Reviews*, vol. 10, no. 2, pp. 435–443, Apr. 2018.

[67] M. Dahesh, "Etude des mécanismes de structuration du gluten : Approche modèle et multi échelles," Ph.D. dissertation, Université de Montpellier, 2014.

[68] P. R. Shewry, B. J. Miflin, E. J.-L. Lew, and D. D. Kasarda, "The Preparation and Characterization of an Aggregated Gliadin Fraction from Wheat," *Journal of Experimental Botany*, vol. 34, no. 11, pp. 1403–1410, 1983.

[69] A. Boire, P. Menut, M.-H. Morel, and C. Sanchez, "Phase behaviour of a wheat protein isolate," *Soft Matter*, vol. 9, no. 47, p. 11417, 2013.

[70] M. Dahesh, A. Banc, A. Duri, M.-H. Morel, and L. Ramos, "Polymeric Assembly of Gluten Proteins in an Aqueous Ethanol Solvent," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, pp. 11 065–11 076, Sep. 2014.

[71] J. Pincemaille, "Interactions et assemblages de protéines du gluten," Ph.D. dissertation, Université de Montpellier, 2018.

[72] J. Brown and R. Flavell, "Fractionation of wheat gliadin and glutenin subunits by two-dimensional electrophoresis and the role of group 6 and group 2 chromosomes in gliadin synthesis," *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 59, no. 6, 1981.

[73] A. Banc, "Approches biomimétiques de l'assemblage de protéines de réserve de blé," Ph.D. dissertation, Université de Bordeaux 1, nov 2007.

[74] D. M. R. Georget and P. S. Belton, "Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by ftir spectroscopy," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 2, pp. 469–475, 2006.

[75] A. S. Tatham and P. R. Shewry, "The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of α-, β-, γ- and ω-Gliadins," *Journal of Cereal Science*, vol. 3, no. 2, pp. 103 – 113, 1985.

[76] T. Mita, E. Ishida, and H. Matsumoto, "Physicochemical studies on wheat protein foams. ii. relationship between bubble size and stability of foams prepared with gluten and gluten components," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 64, no. 1, pp. 143 – 153, 1978.

[77] V. Ducel, J. Richard, Y. Popineau, and F. Boury, "Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil water interface," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 6, pp. 2088–2093, 2004.

[78] M. A. Bos, B. Dunnewind, and T. van Vliet, "Foams and surface rheological properties of b-casein, gliadin and glycinin," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 31, no. 1-4, pp. 95–105, Sep. 2003.

[79] D. Peng, W. Jin, J. Li, W. Xiong, Y. Pei, Y. Wang, Y. Li, and B. Li, "Adsorption and Distribution of Edible Gliadin Nanoparticles at the Air/Water Interface," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, no. 11, pp. 2454–2460, Mar. 2017.

[80] B. Khatkar, R. Fido, A. Tatham, and J. Schofield, "Functional Properties of Wheat Gliadins. II. Effects on Dynamic Rheological Properties of Wheat Gluten," *Journal of Cereal Science*, vol. 35, no. 3, pp. 307–313, Mar. 2002.

[81] S. Gonzalez-Perez and J. M. Vereijken, "Review sunflower proteins : overview of their physicochemical, structural and functional properties," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 87, pp. 2173–2191, 2007.

[82] M. A. Malik, H. K. Sharma, and C. S. Saini, "Effect of removal of phenolic compounds on structural and thermal properties of sunflower protein isolate," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 53, no. 9, pp. 3455–3464, Sep. 2016.

[83] A. Clérivet, I. Alami, F. Breton, D. Garcia, and C. Sanier, "Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes," *Acta Botanica Gallica*, vol. 143, no. 6, pp. 531–538, Jan. 1996.

[84] D. Karefyllakis, S. Altunkaya, C. C. Berton-Carabin, A. J. van der Goot, and C. V. Nikiforidis, "Physical bonding between sunflower proteins and phenols : Impact on interfacial properties," *Food Hydrocolloids*, vol. 73, pp. 326–334, Dec. 2017.

[85] B. J. F. Hudson, *New and Developing Sources of Food Proteins*. Boston, MA : Springer US : Imprint : Springer, 1994, oCLC : 840284306.

[86] C. Pickardt, P. Eisner, D. R. Kammerer, and R. Carle, "Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (Helianthus annuus L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption," *Food Hydrocolloids*, vol. 44, pp. 208–219, Feb. 2015.

[87] N. M. Lovatto, F. R. Goulart, B. B. Loureiro, C. S. Speroni, A. B. Bender, S. J. Giacomini, J. Radünz Neto, and L. P. D. Silva, "Crambe (Crambe abyssinica) and sunflower (Helianthus annuus) protein concentrates : production methods and nutritional properties for use in fish feed," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 89, no. 3, pp. 2495–2504, Jul. 2017.

[88] N.-B. Song, H.-Y. Song, W.-S. Jo, and K. B. Song, "Physical properties of a composite film containing sunflower seed meal protein and its application in packaging smoked duck meat," *Journal of Food Engineering*, vol. 116, no. 4, pp. 789–795, Jun. 2013.

[89] H. Mazhar, R. Quayle, R. J. Fido, A. K. Stobart, J. A. Napier, and P. R. Shewry, "Synthesis of storage reserves in developing seeds of sunflower," *Phytochemistry*, vol. 48, no. 3, pp. 429 – 432, 1998.

[90] E. Derbyshire, D. Wright, and D. Boulter, "Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds," *Phytochemistry*, vol. 15, no. 1, pp. 3–24, Jan. 1976.

[91] R. Reichelt, K.-D. Schwenke, T. König, W. Pähtz, and G. Wangermann, "Electron microsocpic studies for estimation of the quaternary structure of the 11s globulin (Helianthinin) from sunflower seed (Helianthus annuus L.)," *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, vol. 175, no. 7, pp. 653 – 663, 1980.

[92] K. D. Schwenke, W. Pahtz, K. J. Linow, B. Raab, and M. Schultz, "On seed proteins part 11. purification, chemical composition, and some physico-chemical properties of the 11 s globulin (helianthinin) in sunflower seed," *Nahrung*, vol. 23.3, pp. 241–254, 1979.

[93] S. Gonzalez-Perez, J. M. Vereijken, K. B. Merck, G. A. von Koningsveld, H. Gruppen, and A. G. J. Voragen, "Conformational states of sunflower (helianthus annuus) helianthinin : Effect of heat and ph," *J. Agric. Food Chemistry*, vol. 52, pp. 6770–6778, 2004.

[94] R. A. Y. Haar, R. D. Allen, E. A. Cohen, C. L. Nessler, and T. L. Thomas, "Organization of the sunflower 11s storage protein gene family," *Gene*, vol. 74, no. 2, pp. 433 – 443, 1988.

[95] M. I. Molina, S. Petruccelli, and M. C. Anon, "Effect of ph and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11s globulin of sunflower (helianthus annuus)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 6023–6029, 2004.

[96] S. Gonzalez-Perez, "Sunflower Proteins," in *Sunflower*. Elsevier, 2015, pp. 331–393.

[97] P. Plietz, G. Damaschun, J. J. Muller, and K. D. Schwenke, "The structure of 11-S globulins from sunflower and rape seed a small-angle x-ray scattering study," *Eur. J. Biochem.*, vol. 130, pp. 315–320, 1983.

[98] M. Dalgalarrondo, J. Raymon, and J.-L. Azana, "Sunflower seed proteins : Characterization and subunit composition of the globulin fraction," *Journal of Experimental Botany*, vol. 35, no. 11, pp. 1618–1628, 1984.

[99] I. N. Anisimova, R. J. Fido, A. S. Tatham, and P. R. Shewry, "Genotypic variation and polymorphism of 2s albumins of sunflower," *Euphytica*, vol. 83, no. 1, pp. 15–23, Feb. 1995.

[100] A. A. Kortt and J. Caldwell, "Low molecular weight albumins from sunflower seed : identification of a methionine-rich albumin," *Phytochemistry*, vol. 29, no. 9, pp. 2805 – 2810, 1990.

[101] S. Gonzalez-Perez, J. M. Vereijken, G. A. von Koningsveld, H. Gruppen, and A. G. J. Voragen, "Physicochemical properties of 2s albumins and the corresponding protein isolate from sunflower (helianthus annuus)," *J of Food Science*, vol. 70, pp. 98–103, 2005.

[102] M. J. Pandya, R. B. Sessions, P. B. Williams, C. E. Dempsey, A. S. Tatham, P. R. Shewry, and A. R. Clarke, "Structural characterization of a methionine-rich, emulsifying protein from sunflower seed," *Proteins : Structure, Function, and Genetics*, vol. 38, no. 3, pp. 341–349, Feb. 2000.

[103] S. González-Pérez, J. M. Vereijken, K. B. Merck, H. Gruppen, and A. G. J. Voragen, "Emulsion Properties of Sunflower (*Helianthus annuus*) Proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 2261–2267, Mar. 2005.

[104] J. Rodriguezpatino, J. Minonesconde, H. Linares, J. Pedrochejimenez, C. Carrerasanchez, V. Pizones, and F. Rodriguez, "Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate," *Food Hydrocolloids*, vol. 21, no. 5-6, pp. 782–793, Jul. 2007.

[105] S. González-Pérez, J. M. Vereijken, K. B. Merck, H. Gruppen, and A. G. J. Voragen, "Emulsion Properties of Sunflower (*Helianthus annuus*) Proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 2261–2267, Mar. 2005.

[106] Y. Popineau, A. S. Tatham, P. R. Shewry, D. Marion, and J. Guéguen, "2s Sunflower Albumins : Functional Properties of Native and Modified Proteins," in *Plant Proteins from European Crops*, J. Guéguen and Y. Popineau, Eds. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1998, pp. 131–135.

[107] A. C. Sanchez and J. Burgos, "Factors Affecting the Gelation Properties of Hydrolyzed Sunflower Proteins," *Journal of Food Science*, vol. 62, no. 2, pp. 284–288, Mar. 1997.

[108] S. E. Fleming, F. W. Sosulski, and N. W. Hamon, "Gelation and phenomena of vegetable protein products," *Journal of Food Science*, vol. 40, no. 4, pp. 805–807, Jul. 1975.

[109] I. Schmidt, D. Renard, D. Rondeau, P. Richomme, Y. Popineau, and M. A.-V. Axelos, "Detailed Physicochemical Characterization of the 2S Storage Protein from Rape (*Brassica napus* L.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 19, pp. 5995–6001, Sep. 2004.

[110] S. H. Tan, R. J. Mailer, C. L. Blanchard, and S. O. Agboola, "Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals," *Food Research International*, vol. 44, no. 4, pp. 1075–1082, May 2011.

[111] G. Chabanon, "Hydrolyses enzymatiques d'isolats proteiques issus de tourteaux de colza," Ph.D. dissertation, Ecole national polytechnique de Lorraine, 2005.

[112] M. Naczk, R. Amarowicz, A. Sullivan, and F. Shahidi, "Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola : a review," *Food Chemistry*, vol. 62, no. 4, pp. 489–502, Aug. 1998.

[113] S. H. Tan, R. J. Mailer, C. L. Blanchard, and S. O. Agboola, "Canola Proteins for Human Consumption : Extraction, Profile, and Functional Properties," *Journal of Food Science*, vol. 76, no. 1, pp. R16–R28, Jan. 2011.

[114] W. J. Evans, E. J. McCourtney, and R. I. Shrager, "Titration studies of phytic acid," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 59, no. 4, pp. 189–191, Apr. 1982.

[115] M. Cheryan and J. J. Rackis, "Phytic acid interactions in food systems," *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 13, no. 4, pp. 297–335, Dec. 1980.

[116] M. R. Tandang-Silvas, T. Fukuda, C. Fukuda, K. Prak, and C. Cabanos, "Conservation and divergence on plant seed 11s globulines based on crystal structures." *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1804, pp. 1432–1442, 2010.

[117] M. Rico, M. Bruix, C. González, R. I. Monsalve, and R. Rodríguez, "1h nmr assignment and global fold of napin bnib, a representative 2s albumin seed protein," *Biochemistry*, vol. 35, no. 49, pp. 15 672–15 682, 1996, pMID : 8961930.

[118] S. Yonsel, "Extraction of protein mixture from rapeseed for food applications," Ph.D. dissertation, Wageningen University, 2018.

[119] K. D. Schwenke, M. Schultz, K.-J. Linow, K. Gast, and D. Zirwer, "Hydrodynamic and quasi-elastic light scattering studies on the 12s globulin from rapeseed," *International Journal of Peptide and Protein Research*, vol. 16, no. 1, pp. 12–18, Jan. 2009.

[120] K. D. Schwenke, B. Raab, K.-J. Linow, W. Pahtz, and J. Uhlig, "Isolation of the 12 S globulin from Rapeseed (Brassica napus L.) and characterization as a "neutral" protein On seed proteins. Part 13," *Food / Nahrung*, vol. 25, no. 3, pp. 271–280, 1981.

[121] S. Perera, T. McIntosh, and J. Wanasundara, "Structural Properties of Cruciferin and Napin of Brassica napus (Canola) Show Distinct Responses to Changes in pH and Temperature," *Plants*, vol. 5, no. 3, p. 36, Sep. 2016.

[122] R. Jung, Y. W. Nam, I. Saalbach, K. Müntz, and N. C. Nielsen, "Role of the sulfhydryl redox state and disulfide bonds in processing and assembly of 11s seed globulins." *The Plant Cell*, vol. 9, no. 11, pp. 2037–2050, 1997.

[123] A. E. Simon, K. M. Tenbarge, S. R. Scofield, R. R. Finkelstein, and M. L. Crouch, "Nucleotide sequence of a cDNA clone of Brassica napus 12s storage protein shows homology with legumin from Pisum sativum," *Plant Molecular Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 191–201, May 1985.

[124] M. Dalgalarrondo, J.-M. Robin, and J.-L. Azanza, "Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed (Brassica napus L.)," *Plant Science*, vol. 43, no. 2, pp. 115 – 124, 1986.

[125] R. I. Monsalve, M. Villalba, C. López-Otín, and R. Rodríguez, "Structural analysis of the small chain of the 2s albumin, napin nIII, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1078, no. 2, pp. 265 – 272, 1991.

[126] E. Muren, B. Ek, I. Bjork, and L. Rask, "Structural Comparison of the Precursor and the Mature Form of Napin, the 2s Storage Protein in Brassica napus," *European Journal of Biochemistry*, vol. 242, no. 2, pp. 214–219, Dec. 1996.

[127] J.-P. Krause and K. Schwenke, "Behaviour of a protein isolate from rapeseed (Brassica napus) and its main protein components — globulin and albumin — at air/solution and solid interfaces, and in emulsions," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 21, no. 1-3, pp. 29–36, Jul. 2001.

[128] K. D. Schwenke, Y. H. Kim, J. Kroll, E. Lange, and G. Mieth, "Modification of the low-molecular weight basic albumin fraction from rapeseed (Brassica napus L.) by acetylation. Part 2. Selected functional properties," *Food / Nahrung*, vol. 35, no. 3, pp. 293–301, 1991.

[129] S. H. Tan, R. J. Mailer, C. L. Blanchard, and S. O. Agboola, "Emulsifying properties of proteins extracted from Australian canola meal," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 57, no. 1, pp. 376–382, Jun. 2014.

[130] L. W. Léger and S. D. Arntfield, "Thermal gelation of the 12s canola globulin," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 70, no. 9, pp. 853–861, Sep. 1993.

[131] R. Khattab and S. Arntfield, "Functional properties of raw and processed canola meal," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 42, no. 6, pp. 1119–1124, Jul. 2009.

[132] M. Aider and C. Barbana, "Canola proteins : composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, no. 1, pp. 21–39, Jan. 2011.

[133] P. Culmann, "Nouveaux réfractomètres," *Journal de Physique Théorique et Appliquée*, vol. 10, no. 1, pp. 691–704, 1901.

[134] E. Abbe and B. Dibner, *Neue Apparate zur Bestimmung des Brechungs- und Zerstreuungsvermögens fester und flüssiger körper*. Jena : Mauke's Verlag (Hermann Dufft), 1874, no. [4], 79, [1] p., 1 folded leaf of plates.

[135] D. E. Aspnes, "Optical properties of thin films," *Thin solid films, 89*, pp. 249–262, 1982.

[136] S. Arntfield and E. Murray, "The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation," *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, vol. 14, no. 4, pp. 289–294, Jan. 1981.

[137] C. Giancola, C. De Sena, D. Fessas, G. Graziano, and G. Barone, "DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 20, no. 3, pp. 193–204, Jun. 1997.

[138] W. Hergert and T. Wriedt, *The Mie Theory*. Springer, 2012.

[139] V. Roger, "Viscosité et dynamique microscopique dans les suspensions colloïdales concentrées," Ph.D. dissertation, Université de Montpellier, 2015.

[140] V. Roger, H. Cottet, and L. Cipelletti, "A New Robust Estimator of Polydispersity from Dynamic Light Scattering Data," *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 5, pp. 2630–2636, Mar. 2016.

[141] J. Appell, G. Porte, and E. Buhler, "Self-Diffusion and Collective Diffusion of Charged Colloids Studied by Dynamic Light Scattering," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 27, pp. 13 186–13 194, Jul. 2005.

[142] D. E. Koppel, "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy : The Method of Cumulants," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 57, no. 11, pp. 4814–4820, Dec. 1972.

[143] M. Gilliot, "Caractérisation de couches minces nanostruturées par ellipsometrie spectroscopique," Ph.D. dissertation, Universite Paul Verlaine, 2006.

[144] F. Bernoux, J. Piel, B. Castellon, and C. Defranoux, "Ellipsométrie," *Technique de l'ingénieur, traité Mesures et Contrôle*, 2000.

[145] H. G. Tompkins and E. A. Irene, Eds., *Handbook of ellipsometry*. Norwich, NY : Heidelberg, Germany : William Andrew Pub. ; Springer, 2005.

[146] A. Stocco, G. Su, M. Nobili, M. In, and D. Wang, "In situ assessment of the contact angles of nanoparticles adsorbed at fluid interfaces by multiple angle of incidence ellipsometry," *Soft Matter*, vol. 10, no. 36, pp. 6999–7007, 2014.

[147] R. M. A. Azzam and N. M. Bashara, *Ellipsometry and polarized light*. North-Holland, Amsterdam, 1977.

[148] J. Lekner, *Theory of reflection*. Springer, 28 février 1987.

[149] R. Miller, E. V. Aksenenko, V. S. Alahverdjieva, V. B. Fainerman, C. S. Kotsmar, J. Kragel, M. E. Leser, J. Maldonado-Valderrama, V. Pradines, C. Stefaniu, A. Stocco, and R. Wustneck, *Thermodynamics and kinetics of mixed protein/surfactant adsorption layers at liquid interfaces*. European space Agency, 2013.

[150] J. Meunier, "Optical reflectivity of thin rough films : Application to ellipsometric measurements on liquid films," *Physical Review E*, vol. 75, no. 6, Jun. 2007.

[151] E. G. Bortchagovsky, V. Lozovski, and T. Mishakova, *Model for the effective medium approximation of nanostructured layers with the account of interparticle interactions*, T. S. Vladimir Kuzmiak, Peter Markos, Ed. Proc. os SPIE, 05 2011, vol. 8070.

[152] A. Stocco, K. Tauer, S. Pispas, and R. Sigel, "Dynamics of amphiphilic diblock copolymers at the air–water interface," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 355, pp. 172–178, Mar. 2011.

[153] J. P. R. Day, P. D. A. Pudney, and C. D. Bain, "Ellipsometric study of the displacement of milk proteins from the oil–water interface by the non-ionic surfactant C10e8," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 18, p. 4590, 2010.

[154] A. N. Bashkatov and E. A. Genina, "Water refractive index in dependence on temperature and wavelength : a simple approximation," in *Water refractive index in dependence on temperature and wavelength*, V. V. Tuchin, Ed., Oct. 2003, pp. 393–395.

[155] T. Young, "An essay on the cohesion of fluids," *Philosophical transactions of the royal society of London*, vol. 95, pp. 65–87, 1805.

[156] P. S. Laplace, *Supplément au livre X du Traité de mécanique céleste. Sur l'action capillaire*. Gallica, 1806, vol. 349–417.

[157] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. Chan, and R. F. Tabor, "Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 454, pp. 226–237, Sep. 2015.

[158] R. Miller, J. K. Ferri, A. Javadi, J. Krägel, N. Mucic, and R. Wüstneck, "Rheology of interfacial layers," *Colloid and Polymer Science*, vol. 288, no. 9, pp. 937–950, Jun. 2010.

[159] J. Lucassen and M. Van Den Tempel, "Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface," *Chemical Engineering Science*, vol. 27, no. 6, pp. 1283–1291, Jun. 1972.

[160] H. Xu, P. X. Li, K. Ma, R. K. Thomas, J. Penfold, and J. R. Lu, "Limitations in the Application of the Gibbs Equation to Anionic Surfactants at the Air/Water Surface : Sodium Dodecylsulfate and Sodium Dodecylmonooxyethylenesulfate Above and Below the CMC," *Langmuir*, vol. 29, no. 30, pp. 9335–9351, Jul. 2013.

[161] J. K. Ferri, N. Gorevski, C. Kotsmar, M. E. Leser, and R. Miller, "Desorption kinetics of surfactants at fluid interfaces by novel coaxial capillary pendant drop experiments," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 319, no. 1-3, pp. 13–20, Apr. 2008.

[162] S. Lin, K. McKeigue, and C. Maldarelli, "Diffusion-controlled surfactant adsorption studied by pendant drop digitization," *AIChE Journal*, vol. 36, no. 12, pp. 1785–1795, 12 1990.

[163] H. Wege, J. Holgado-Terriza, A. Neumann, and M. Cabrerizo-Vilchez, "Axisymmetric drop shape analysis as penetration film balance applied at liquid–liquid interfaces," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 156, no. 1-3, pp. 509–517, Oct. 1999.

[164] J. M. Brake and N. L. Abbott, "An experimental system for imaging the reversible adsorption of amphiphiles at aqueous/liquid crystal interfaces," *Langmuir*, vol. 18, no. 16, pp. 6101–6109, Aug. 2002.

[165] H. N. Po and N. M. Senozan, "The Henderson-Hasselbalch Equation : Its History and Limitations," *Journal of chemical education*, vol. 78, pp. 1499–1503, 2001.

[166] G. N. Lewis and M. Randall, "The activity coefficient of strong electrolytes," *Chemical laboratory of University of California*, p. 43, 1921.

[167] Z. Zhang and M. G. Scanlon, "Solvent effects on the molecular structures of crude gliadins as revealed by density and ultrasound velocity measurements," *Journal of Cereal Science*, vol. 54, pp. 181–186, Sep. 2011.

[168] H. Fischer, I. Polikarpov, and A. F. Craievich, "Average protein density is a molecular-weight-dependent function," *Protein Science*, vol. 13, pp. 2825–2828, Jan. 2009.

[169] D. Hand, "The refractivity of protein solutions," *Journal of biological chemistry*, 1935.

[170] J. Kjeldahl, "New method for quantitative nitrogen determination," *Zeitschrift fur analytische Chemie (journal de chimie analytique)*, vol. 22, no. 1, pp. 366 – 383, 1883.

[171] E. Layne, "Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins," in *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins*, ser. Methods in Enzymology. Academic Press, 1957, vol. 3, pp. 447 – 454.

[172] P. Stratil, B. Klejdus, and V. Kubáň, "Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals," *Talanta*, vol. 71, no. 4, pp. 1741–1751, Mar. 2007.

[173] C. Cater, S. Gheyasuddin, and K. Mattil, "The effect of chlorogenic, quinic and caffeic acid on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seed," *Cereal science, 495, 508-14*, 1972.

[174] A. A. Kortt and J. B. Caldwell, "Sunflower 11s globulin, susceptibility to proteolytic cleavage of the subunits of native helianthinin during isolation : Hplc fractionation of the subunits," *Phytochemistry*, vol. 29, no. 5, pp. 1389 – 1396, 1990.

[175] J. Raymond, J. M. Robin, and J. L. Azanza, "11 s seed storage proteins fromhelianthus species (compositae) : Biochemical, size and charge heterogeneity," *Plant Systematics and Evolution*, vol. 198, no. 3, pp. 195–208, Sep 1995.

[176] I. N. Anisimova, R. J. Fido, A. S. Tatham, and P. R. Shewry, "Genotypic variation and polymorphism of 2s albumins of sunflower," *Euphytica*, vol. 83, no. 1, pp. 15–23, Feb 1995.

[177] M. Rostagno, N. Manchón, M. D'Arrigo, E. Guillamón, A. Villares, A. García-Lafuente, A. Ramos, and J. Martínez, "Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column," *Analytica Chimica Acta*, vol. 685, no. 2, pp. 204–211, Jan. 2011.

[178] A. de Vries, Y. Lopez Gomez, B. Jansen, E. van der Linden, and E. Scholten, "Controlling Agglomeration of Protein Aggregates for Structure Formation in Liquid Oil : A Sticky Business," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 11, pp. 10 136–10 147, Mar. 2017.

[179] N. H. Thomson, M. J. Miles, Y. Popineau, J. Harries, P. Shewry, and A. S. Tatham, "Small angle x-ray scattering of wheat seed-storage proteins : α-, γ- and ω-gliadins and the high molecular weight (hmw) subunits of glutenin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1430, no. 2, pp. 359 – 366, 1999.

[180] P. Shukla, P. M. Cotts, R. D. Miller, T. P. Russell, B. A. Smith, G. M. Wallraff, M. Baier, and P. Thiyagarajan, "Conformational transition studies of organosilane polymers by light and neutron scattering," *Macromolecules*, vol. 24, no. 20, pp. 5606–5613, Sep. 1991.

[181] A. Rizos, D. Spandidos, and E. Krambovitis, "Light scattering characterization of synthetic MUC-1 peptides and their behavior in dilute solution," *International Journal of Molecular Medicine*, Oct. 2003.

[182] E. H. Rahma and M. S. Narasinga, "Characterization of sunflower proteins," *Journal of food science*, vol. 44, pp. 579–582, 1979.

[183] A. M. Shetty and M. J. Solomon, "Aggregation in dilute solutions of high molar mass poly(ethylene) oxide and its effect on polymer turbulent drag reduction," *Polymer*, vol. 50, no. 1, pp. 261 – 270, 2009.

[184] W.-W. Sun, S.-J. Yu, X.-Q. Yang, J.-M. Wang, J.-B. Zhang, Y. Zhang, and E.-L. Zheng, "Study on the rheological properties of heat-induced whey protein isolate–dextran conjugate gel," *Food Research International*, vol. 44, no. 10, pp. 3259–3263, Dec. 2011.

[185] C. M. Lakemond, H. H. de Jongh, M. Paques, T. van Vliet, H. Gruppen, and A. G. Voragen, "Gelation of soy glycinin ; influence of ph and ionic strength on network structure in relation to protein conformation," *Food Hydrocolloids*, vol. 17, no. 3, pp. 365 – 377, 2003.

[186] J. Topps, "Canola and rapeseed. Production, chemistry, nutrition and processing technology," *Bioresource Technology*, vol. 40, no. 3, p. 283, Jan. 1992.

[187] J. Wu and A. Muir, "Comparative Structural, Emulsifying, and Biological Properties of 2 Major Canola Proteins, Cruciferin and Napin," *Journal of Food Science*, vol. 73, no. 3, pp. C210–C216, Apr. 2008.

[188] R. Miller, V. B. Fainerman, E. V. Aksenenko, M. E. Leser, and M. Michel, "Dynamic Surface Tension and Adsorption Kinetics of β-Casein at the Solution/Air Interface," *Langmuir*, vol. 20, no. 3, pp. 771–777, Feb. 2004.

[189] L. Razumovsky and S. Damodaran, "Surface activity-compressibility relationship of proteins at the air-water interface," *Langmuir*, vol. 15, no. 4, pp. 1392–1399, Feb. 1999.

[190] V. B. Fainerman, R. Miller, and V. I. Kovalchuk, "Influence of the Compressibility of Adsorbed Layers on the Surface Dilational Elasticity," *Langmuir*, vol. 18, no. 20, pp. 7748–7752, Oct. 2002.

[191] V. Ulaganathan, I. Retzlaff, J. Won, G. Gochev, C. Gehin-Delval, M. Leser, B. Noskov, and R. Miller, "β-Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface : 1. Adsorption kinetics and surface pressure isotherm : Effect of pH and ionic strength," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 519, pp. 153–160, Apr. 2017.

[192] J.-M. Wang, N. Xia, X.-Q. Yang, S.-W. Yin, J.-R. Qi, X.-T. He, D.-B. Yuan, and L.-J. Wang, "Adsorption and Dilatational Rheology of Heat-Treated Soy Protein at the Oil–Water Interface : Relationship to Structural Properties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 12, pp. 3302–3310, Mar. 2012.

[193] L. Liu, Q. Zhao, T. Liu, and M. Zhao, "Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate/xanthan gum mixtures at the oil–water interface," *Food Hydrocolloids*, vol. 25, no. 5, pp. 921–927, Jul. 2011.

[194] T. van Vliet, A. H. Martin, and M. A. Bos, "Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 7, no. 5-6, pp. 462–468, Nov. 2002.

[195] J. Benjamins, J. A. de Feijter, M. T. A. Evans, D. E. Graham, and M. C. Phillips, "Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface," *Faraday Discussions of the Chemical Society*, vol. 59, p. 218, 1975.

[196] D. E. Graham and M. C. Phillips, "Proteins at liquid interfaces : II adsorption isotherms," *Journal of colloid and Interface science*, vol. 70, pp. 415–426, 1979.

[197] M. Blank, J. Lucassen, and M. van den Tempel, "The elasticities of spread monolayers of bovine serum albumin and of ovalbumin," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 33, no. 1, pp. 94–100, May 1970.

[198] M. A. Bos and T. van Vliet, "Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants : a review," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 91, no. 3, pp. 437–471, Jul. 2001.

[199] A. Hambardzumyan, V. Aguie-Beghin, M. Daoud, and R. Douillard, "b-casein and symmetrical triblock copolymer, surface properties at air water interface," *Langmuir*, vol. 20, no. 3, pp. 756–763, Feb. 2004.

[200] M. Lexis and N. Willenbacher, "Relating foam and interfacial rheological properties of β-lactoglobulin solutions," *Soft Matter*, vol. 10, no. 48, pp. 9626–9636, 2014.

[201] C. Ybert and J.-M. di Meglio, "Ascending air bubbles in protein solutions," *The European Physical Journal B*, vol. 4, no. 3, pp. 313–319, Aug. 1998.

[202] P. Erni, E. J. Windhab, and P. Fischer, "Emulsion Drops with Complex Interfaces : Globular Versus Flexible Proteins," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 296, no. 3-4, pp. 249–262, Mar. 2011.

[203] D. Barthes-Biesel and H. Sgaier, "Role of membrane viscosity in the orientation and deformation of a spherical capsule suspended in shear flow," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 160, p. 119–135, 1985.

[204] A. Williams, J. Janssen, and A. Prins, "Behaviour of droplets in simple shear flow in the presence of a protein emulsifier," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 125, no. 2-3, pp. 189–200, Jun. 1997.

[205] R. Mothes, K. D. Schwenke, D. Zirwer, and K. Gast, "Rapeseed protein — polyanion interactions. Soluble complexes between the 2 S protein fraction (napin) and phytic acid," *Food / Nahrung*, vol. 34, no. 4, pp. 375–385, 1990.

Les enjeux de santé publique et de développement durable conduisent à intensifier l'utilisation de protéines végétales notamment dans les secteurs de biens de consommation comme l'industrie pharmaceutique, l'agro-alimentaire et les cosmétiques. La levée récente de certains verrous technologiques permet aujourd'hui la purification industrielle de protéines végétales issues de tourteaux provenant de la production d'huiles végétales. Ces protéines sont valorisables comme substituts aux graisses saturées dans la structuration d'huiles à destination de la consommation humaine. Le manque de texture d'huiles végétales insaturées peut être compensé par ces protéines jouant le rôle de stabilisants et de gélifiants dans les émulsions. Nous nous intéressons aux propriétés fonctionnelles des protéines de blé, de tournesol et de colza, en volume et aux interfaces. Nous avons montré que des gels de protéines de tournesol avec des élasticités modulables sont obtenus par dénaturation thermique. La dynamique de formation de films protéiques aux interfaces fluides a été étudiée en combinant des mesures de tensiométrie, de viscoélasticité dilatationnelle et d'ellipsométrie. Les mesures sur plusieurs ordres de grandeurs en concentrations et en temps mettent en évidence différents régimes de structuration associés à différentes dynamiques d'adsorption pour les trois protéines de blé, de tournesol et de colza étudiées. Nous discutons également le rôle de la flexibilité des protéines dans ces différents régimes de structuration.

Mots clés : Protéines végétales, Gluten, Tournesol, Colza, Interface, Gel, Tension de surface dynamique, Rhéologie, Rhéologie interfaciale, Ellipsométrie.

Avertissement :
Ce document est confidentiel, et a été réalisé dans le cadre du programme de recherche GENESYS de la SAS PIVERT. Il ne peut être ni reproduit ni exploité sans l'autorisation expresse de la SAS PIVERT.

Challenges of public health and sustainable development trend to intensify the use of vegetables proteins, particularly in consumer goods sectors such as pharmaceutical, food and cosmetics industries. The recent overcome of technical limitation allows the industrial purification of vegetables proteins derived from meal made by vegetable oils production. These proteins are valuable as substitutes for saturated fats in structuring oils for human consumption. The lack of unsaturated vegetable oil texture can be reduced by these proteins acting as stabilizers and gelling agents in emulsions. We are interested in the functional properties of wheat, sunflower and rapeseed proteins, by volume and at interfaces. We have shown that sunflower protein gels with modulable elasticities are obtained by thermal denaturation. In addition, we studied the dynamics of protein film formation at fluid interfaces by combining measurements of tensiometry, dilatational viscoelasticity and ellipsometry. We highlight different structuring regimes and discuss the role of protein flexibility in this structuring.

Keywords : Plant proteins, Gluten, Sunflower, Rapeseed, Interface, Gel, Dynamic surface tension, Rheology, Interfacial Rheology, Ellipsometry.