



HAL
open science

Étude de la variabilité de la réaction de glycation dans des gels de gélatine par une approche multi-échelle

Charlotte Dumoulin

► **To cite this version:**

Charlotte Dumoulin. Étude de la variabilité de la réaction de glycation dans des gels de gélatine par une approche multi-échelle. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03701692

HAL Id: hal-03701692

<https://hal.inrae.fr/hal-03701692>

Submitted on 22 Jun 2022

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.

Mémoire de Master 2 Nutrition et Sciences des Aliments

Année universitaire : 2021-2022

Parcours : SA (Sciences des Aliments)

**Étude de la variabilité de la réaction de glycation dans des gels de gélatine
par une approche multi-échelle**

Par : **Charlotte DUMOULIN**

INRAE

INRAE, Route de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle

Stage du 10.01.2022 au 08.07.2022

Soutenu à Nantes le : 27.06.2022

Document confidentiel : oui - non

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Véronique SANTÉ-LHOUTELLIER, directrice de l'Unité QuaPA, M. Pierre-Sylvain MIRADE, directeur-adjoint de cette même unité de m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 au sein de QuaPA.

Je remercie tout particulièrement mon maître de stage, M. Stéphane PORTANGUEN, pour sa patience et sa bienveillance tout au long de ces 6 mois, et pour tous nos moments d'échanges qui m'ont énormément apporté.

Un grand merci à M. Thierry ASTRUC, Mme Anne DUCONSEILLE, M. Jacques ROUEL et Mme Annie VENIEN pour leur nombreux conseils et leur pédagogie.

Je remercie également chaleureusement l'ensemble de mes collègues de l'équipe IT et plus largement l'ensemble de l'unité QuaPA pour l'accueil chaleureux et l'ambiance conviviale dans laquelle s'est déroulé mon stage. J'ai passé un excellent moment à vos côtés et ai beaucoup appris grâce à vous tous. Cela a été un véritable plaisir de travailler avec vous !

Pour finir, merci à mon enseignante référente, Mme Marie DE LAMBALLERIE, pour son accompagnement et nos échanges tout au long de ce stage.

Liste des abréviations et acronymes utilisés

AGE : Advanced Glycation End Product (produit avancé de glycation)

BPM : équipe Biochimie et Protéines du Muscle

B125 : gélatine 125-bloom

B200 : gélatine 200-bloom

EPST : Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique

FT-IR : Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

G : gels glyqués

H : gélatine dite "humide"

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INRAE : Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

IRSTEA : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

IT : équipe Imagerie & Transferts

LVR : Linear Viscoelastic Region (domaine de viscoélasticité linéaire)

MASS : équipe Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MET : Microscopie Électronique en Transmission

NG : gels non glyqués

QuaPA : Qualité des Produits Animaux

S : gélatine dite "sèche"

TPA : Texture Profile Analysis

UR : Unité de Recherche

Liste des Figures

Figure 1 : Mécanismes de glycation dans des films à base de protéines d'isolat de cacahuète et de xylose (d'après Liu et al., 2017).....	11
Figure 2 : Schéma de l'organisation d'une fibre de collagène (tiré de Tawrog, 2017)	14
Figure 3 : Les différentes voies de formation des triple-hélices de gélatine (tiré de Portier, 2016)	15

Liste des Tableaux

Tableau I : Composition en acides aminés de la gélatine de peau de porc (tiré de Duconseille et al., 2017a).....	14
Tableau II : Plan d'expérience	19
Tableau III : Récapitulatif des pesées.....	20
Tableau IV : Nombres d'ondes (en cm-1) caractéristiques en fonction des différences significatives observées entre les absorbances	28
Tableau V : Comparaison des nombres d'ondes (en cm-1) significativement différents en fonction des conditions expérimentales	29
Tableau VI : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des mesures de TPA pour les différentes conditions étudiées	31
Tableau VII : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des mesures de texture lorsque l'on croise les variables "Bloom" et "Humidité" avec la variable "Glyqué/non glyqué"	33
Tableau VIII : Données issues des mesures rhéologiques	35
Tableau IX : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des traitements de TPA et de rhéologie lorsque l'on croise les variables "Bloom" et "Humidité" avec la variable "glyqué/non glyqué"	37

Liste des Annexes

Annexe 1 : Exemples de gels glyqués et non glyqués obtenus	46
Annexe 2 : Observation de gels de gélatine en microscopie électronique en transmission	47
Annexe 3 : Exemple de spectre entier obtenu après correction de ligne de base et normalisation (gélatine 125-bloom glyquée en condition sèche).....	49
Annexe 4 : Exemple de spectre obtenu après correction de ligne de base, normalisation et dérivation (gélatine 125-bloom glyquée en condition sèche)	49
Annexe 5 : ACP réalisée sur les dérivées secondes des bandes amides I et II et des sucres – Comparaison de l’effet de l’humidité initiale de la gélatine	50
Annexe 6 : ACP réalisée sur les dérivées secondes des bandes amides I et II et des sucres – Comparaison de l’effet de la glycation.....	50
Annexe 7 : Structures chimiques attribuées aux longueurs d’ondes caractéristiques issues de la littérature.	51
Annexe 8 : Analyse en composantes principales réalisée sur les variables de TPA et de rhéologie.....	52
Annexe 9 : Courbe théorique obtenue à l’issue d’une mesure de TPA (capture d’écran du logiciel TRAPEZIUM X).....	52
Annexe 10 : Définitions des différents paramètres de TPA mesurés.....	53
Annexe 11 : Détermination des paramètres de rhéologie, exemple de la condition 125-bloom glyquée en condition sèche.....	54

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Présentation de l'organisme de recherche.....	3
1. INRAE.....	3
2. Le centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes et l'Unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA)	3
3. L'équipe Imagerie & Transferts	4
Partie 2 : Comment expliquer la variabilité de l'effet de la glycation sur la texture des gels de gélatine ?.....	5
1. Travaux antérieurs.....	5
1.1. La glycation, un moyen de renforcer les propriétés mécaniques des matrices protéiques... ..	5
1.1.1. Effets de la glycation à l'échelle macroscopique.....	6
1.1.2. Effets de la glycation à l'échelle microscopique	9
1.1.3. Effets de la glycation à l'échelle moléculaire	10
1.2. ... Mais qui ne permet pas toujours d'obtenir l'effet texturant escompté.....	12
1.3. Caractéristiques structurales de la gélatine	13
1.3.1. Informations générales.....	13
1.3.2. Interactions eau-gélatine	16
2. Matériel et méthodes	18
2.1. Préparation des gels.....	18
2.2. Microscopie électronique en transmission	20
2.3. Spectroscopie FT-IR	22
2.4. Mesures des propriétés mécaniques	23
2.4.1. Mesures de texture (Texture Profile Analysis)	23
2.4.2. Rhéologie	23
2.5. Traitements statistiques	24
3. Résultats et discussion.....	24
3.1. Microscopie électronique en transmission	24
3.2. Spectroscopie FT-IR	27
3.3. Mesures des propriétés mécaniques	31
3.3.1. Mesures de texture	31
3.3.2. Rhéologie	34
3.4. Synthèse des résultats obtenus	38

Conclusion.....	40
Références bibliographiques	41
Annexes	46

Introduction

L'impression 3D semble être une approche prometteuse pour proposer des produits adaptés aux personnes atteintes de problèmes masticatoires car elle permettrait de leur fournir des produits personnalisés enrichis en protéines, dont on maîtriserait la texture et la composition. Le projet européen PERFORMANCE (Personalized Food using Rapid Manufacturing for the Nutrition of Elderly Consumers) (2012-2015) s'est intéressé au développement de tels produits dans le but d'améliorer la nutrition des personnes souffrant de dysphagie, néanmoins leur développement a nécessité l'utilisation de grandes quantités d'additifs, et en particulier des gélifiants (Commission Européenne, 2015). Les attentes actuelles des consommateurs étant plutôt tournées vers la consommation de produits sans additifs, il est nécessaire de trouver d'autres solutions pour texturer ces produits.

La réaction de glycation est une alternative à l'utilisation d'additifs texturants qui pourrait constituer une solution à cette problématique. En effet, il a été montré que cette suite de réactions complexes, initiée par la formation d'une liaison covalente entre un acide aminé et un sucre réducteur permet d'améliorer la texture de certaines matrices (Wang *et al.*, 2022). Néanmoins cette réaction a tendance à former des produits indésirables au fil de son avancement. Ces produits avancés de glycation (ou AGE, Advanced Glycation End Products) étant potentiellement à l'origine d'effets délétères sur la santé, il est nécessaire de limiter leur production au maximum lors de l'utilisation de la réaction de glycation pour texturer le produit.

Dans ce contexte, le sujet initial de mon stage de 3^{ème} année d'école d'ingénieur et de Master 2 Nutrition et Science des Aliments portait sur le développement de méthodes permettant de suivre l'avancement de la réaction de glycation au sein de gels de gélatine, et en particulier de suivre la production d'AGE au cours de la réaction. L'objectif était de se servir de cette réaction pour texturer des gels de gélatine qui seraient enrichis en protéines de haute qualité nutritionnelle et imprimés en 3D afin de pouvoir adapter leur structure aux besoins de personnes âgées souffrant de problèmes masticatoires. Des essais préliminaires avaient permis de montrer que la réaction de glycation permettait d'augmenter la fermeté de gels de gélatine, utilisée alors comme milieu modèle pour définir les paramètres réactionnels de la glycation. Néanmoins, après un changement de lot de gélatine ainsi que la réalisation de plusieurs pré-essais sur différents lots suite à mon arrivée, il s'est avéré que la réaction de glycation ne permettait pas toujours d'augmenter la fermeté de la gélatine. À la fin de la période de pré-essais, nous devons commencer le développement de méthodes de suivi de la réaction de

glycation, mais comme l'effet de celle-ci était très aléatoire sur la texturation en fonction des gels étudiés, cela ne présentait plus vraiment de sens. Nous avons donc décidé de nous pencher sur l'étude des mécanismes associés à la variabilité de la réaction de glycation. Une approche multi-échelle a alors été adoptée pour comprendre cette variabilité.

La première partie de ce rapport présentera la structure dans laquelle j'ai réalisé mon stage. Puis, dans une seconde partie, nous nous pencherons sur l'étude des mécanismes physico-chimiques permettant d'expliquer la variabilité de la réaction de glycation. Étant donné que le sujet de mon stage a évolué, une synthèse bibliographique a été ajoutée afin de pouvoir recentrer l'état de l'art sur la nouvelle problématique.

Partie 1 : Présentation de l'organisme de recherche

1. INRAE

INRAE, l'Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, est un organisme de recherche publique placé sous la tutelle du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, et du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (INRAE, 2021a).

Initialement nommé INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), cet établissement a été créé en 1946 pour moderniser l'agriculture et faire face à la pénurie alimentaire à laquelle la France est confrontée à la fin de la Seconde Guerre Mondiale. Ses applications de recherche se sont peu à peu élargies, l'Institut se tournant vers l'industrie agroalimentaire, les biotechnologies, la nutrition, la gestion et la protection des ressources naturelles, et de manière plus globale tout ce qui a trait au vivant (INRAE, 2021b).

Au 1^{er} janvier 2020, l'INRA fusionne avec l'IRSTEA (Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture) et devient INRAE. L'objectif de cette fusion est de faire de ce nouvel Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) un des leaders mondiaux de la recherche dans les domaines de l'agriculture, de l'environnement et de l'alimentation, en s'appuyant sur la complémentarité des disciplines de recherche et des compétences des deux instituts dont il est issu.

De par ses nombreuses collaborations avec un grand nombre de centres de recherche, universités et industries à travers dans le monde, l'Institut possède un fort rayonnement à l'international. Son ambition est de contribuer au développement durable à l'échelle de la planète, en fournissant des solutions innovantes pour préserver l'environnement et mettre en place une agriculture plus durable et une alimentation plus saine (INRAE, 2021b).

2. Le centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes et l'Unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA)

L'institut regroupe 18 centres de recherche répartis sur tout le territoire, et compte 14 départements de recherche. Ces centres regroupent des unités, elles-mêmes constituées de différentes équipes.

Mon stage s'est déroulé au sein du centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes, sur le site de Theix (63). Ce centre et le centre Lyon-Grenoble-Auvergne-Rhône-Alpes travaillent sur 6 grandes

thématiques dont les risques naturels, sanitaires et environnementaux, l'agroécologie des systèmes d'élevage herbagers et la nutrition humaine.

J'ai travaillé au sein de l'équipe Imagerie & Transferts de l'Unité de Recherche Qualité des Produits Animaux (UR370 QuaPA), intégrée au département TRANSFORM. Les activités de recherche de ce département sont tournées vers les processus de transformation des matières organiques en aliments et produits bio-sourcés et sur la valorisation des résidus de l'activité humaine. L'UR370 QuaPA comprend 3 équipes : Biochimie et Protéines du Muscle (BPM), Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives (MASS) et l'équipe Imagerie & Transferts (IT) ainsi que deux plateformes : AgroResonance et Protéomique (INRAE, 2022).

Les recherches de l'unité QuaPA portent principalement sur les produits carnés et sur l'anticipation des adaptations nécessaires à la transition alimentaire notamment en explorant les différentes sources de protéines, la durabilité des systèmes de production, des procédés de fabrication et sur l'étude des besoins spécifiques de certains consommateurs.

Ainsi, l'unité focalise ses recherches suivant deux axes majeurs :

- La conception raisonnée d'aliments carnés spécifiques. Il s'agit alors de prendre en compte l'accessibilité des sources protéiques et d'étudier leur devenir après ingestion par l'Homme
- L'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires afin de préparer la transition alimentaire. Cela s'exprime par la limitation des pertes au cours des procédés, l'étude de la sécurité chimique des produits et la valorisation de la biomasse issue des coproduits animaux

3. L'équipe Imagerie & Transferts

Les travaux de l'équipe Imagerie & Transferts sont focalisés sur le contrôle par le procédé de la qualité des produits carnés, qu'elle soit nutritionnelle, technologique ou sanitaire.

Pour cela, l'équipe s'appuie sur 3 grands domaines de compétences :

- L'imagerie par résonance magnétique
- La microscopie et l'histologie
- L'étude du génie des procédés et la modélisation (INRAE, 2019)

Mon stage m'a amenée à travailler avec les personnes travaillant dans ces deux derniers domaines.

J'ai également été amenée à travailler avec l'équipe BPM pour la réalisation et le traitement de mesures en FT-IR sur des échantillons liquides, ainsi que le Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS) de l'Université Clermont-Auvergne, pour les observations en microscopie électronique en transmission (MET) de nos échantillons.

Partie 2 : Comment expliquer la variabilité de l'effet de la glycation sur la texture des gels de gélatine ?

1. Travaux antérieurs

Depuis quelques temps, la réaction de glycation est beaucoup étudiée pour améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines, qu'elles soient d'origine animale ou végétale (*cf.* rapport bibliographique). Cette réaction a ainsi été utilisée pour améliorer leur solubilité (Saeki et Inoue, 1997 ; Xu *et al.*, 2020), leur pouvoir émulsifiant et moussant (Achouri *et al.*, 2005 ; Chobert *et al.*, 2006) ou encore leur stabilité thermique (Chobert *et al.*, 2006). Certains auteurs se sont également penchés sur les effets de cette réaction sur les propriétés mécaniques et la texture de certaines matrices protéiques, notamment les films qui présentent un fort intérêt pour le développement d'emballages alimentaires biosourcés, ainsi que pour les gels.

1.1. La glycation, un moyen de renforcer les propriétés mécaniques des matrices protéiques...

De nombreux travaux ont montré que la réaction de glycation permettait le renforcement des propriétés mécaniques des films et des gels protéiques. De manière générale, peu de travaux sont publiés sur la glycation de la gélatine, raison pour laquelle nous présenterons également des travaux et résultats obtenus sur d'autres matrices protéiques.

Pour rappel, la glycation, aussi connue sous le nom de réaction de Maillard, est une réaction de brunissement non enzymatique faisant intervenir un sucre réducteur et un acide aminé libre ou au sein d'une protéine (Liu *et al.*, 2012 ; Tessier, 2019). Il s'agit d'une suite de réactions en chaîne dont la première étape consiste en la formation d'une liaison covalente entre le groupement amine d'un acide aminé et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur. En général, cette réaction fait intervenir majoritairement les groupements amines des résidus lysine

de la protéine, mais il peut également faire intervenir d'autres acides aminés comme l'arginine (Liu *et al.*, 2012). Les travaux de Fortune (2021) ont néanmoins attesté de la fixation du ribose sur d'autres acides aminés : la sérine et la thréonine.

1.1.1. Effets de la glycation à l'échelle macroscopique

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux effets macroscopiques de la glycation sur la texture des matrices protéiques. Nous entendons par « effets macroscopiques », l'ensemble des mesures qui permettent de caractériser une matrice du point de vue mécanique et dont la taille de l'échantillon est compatible avec celle d'un aliment.

Deux études ont montré l'effet de la glycation sur la résistance à l'étirement de films protéiques. D'abord, celle de Li *et al.* (2015), qui ont étudié la glycation de matrices à base d'isolat de protéines de cacahuètes avec de la gomme arabique, a souligné le fait que les films glyqués présentaient des valeurs de résistance à l'étirement plus importantes que les films non glyqués au bout d'un temps de glycation de 3 jours (1.76 MPa pour les films glyqués contre 0.77 MPa pour un film non glyqué). Ensuite, Liu *et al.* (2017) ont mis en évidence que la résistance à l'étirement et le pourcentage d'élongation à la rupture d'un film formulé à base d'isolat de protéines dépendait de la concentration en xylose (1 à 10%). Les valeurs de ces deux paramètres mécaniques étaient significativement plus importantes que pour le film témoin (isolat protéique seul) et augmentaient en même temps que la concentration en sucre. Pour une concentration plus importante (20% de xylose), ces valeurs diminuaient légèrement tout en restant toujours supérieures à celles du témoin. L'équipe a émis l'hypothèse qu'au-delà de 10%, la matrice était probablement saturée en sucre, et que les changements dans les valeurs relevées pouvaient être attribués à l'effet plastifiant du xylose. En effet, les sucres de faibles poids moléculaires sont souvent utilisés pour plastifier des gels et des films à base de protéines, car ils permettent de réduire leur fracturabilité. Le glycérol est souvent utilisé en tant que tel, comme par exemple dans les travaux de Liu *et al.* (2017) sur les films à base de protéines de cacahuètes. Leur ajout peut permettre de faire diminuer les forces intermoléculaires inter-chaînes de polymères, ce qui permet d'augmenter leur mobilité, et par conséquent d'améliorer la flexibilité des films (Alee *et al.*, 2021).

Wang *et al.* (2020) ont réalisé des mesures de TPA (Texture Profil Analysis) sur des gels à base de protéines de blanc d'œuf glyqués, soit avec de l'isomalto-oligosaccharide, soit avec du fructo-oligo saccharide. Ils ont remarqué une augmentation progressive de la fermeté et de

l'élasticité des gels obtenus avec différentes durées de glycation (24, 48, 72 et 96h). Au-delà de 96h de glycation, l'équipe a constaté une diminution significative de la fermeté et de l'élasticité des gels (diminution de plus de 25% de la fermeté des gels glyqués à l'isomaltosaccharide, de 5% de la fermeté des gels glyqués au fructo-oligosaccharide, et de 6 et 7% respectivement de l'élasticité des gels ; les valeurs obtenues restent toujours plus élevées que celles du témoin). Les mécanismes à l'origine de cette résistance mécanique permettent de mettre en évidence la formation de liaisons covalentes entre les sucres et les protéines lors de la glycation, qui se traduit par une augmentation du poids moléculaire des protéines contenues dans les gels glyqués au fil du temps, ce qui n'est pas le cas dans les gels témoins. Un changement de la structure secondaire des protéines étudiées est également observé, se traduisant par une augmentation des feuillets- β intra et inter-chaînes, et une diminution des hélices- α . Des mesures en compression ont également permis d'apprécier le renforcement des propriétés mécaniques des gels grâce à la glycation. Il a été observé une augmentation des valeurs de force et de déformation à la rupture des gels glyqués avec le temps de réaction et le ratio sucre/protéines. En 2004, Sun *et al.* avaient réalisé le même type de mesures sur des gels d'ovalbumine glyqués au glucose, au fructose et au psicose et avaient également remarqué que les gels glyqués présentaient des valeurs de force et de déformation à la rupture plus importantes que les gels non glyqués. Comme indiqué dans mon pré-rapport biblio, le temps de réaction est un paramètre fondamental pour la glycation, néanmoins, des temps tels que ceux utilisés dans l'étude de Wang *et al.* (2020), sont incompatibles avec la transformation de produits alimentaires (risque sanitaire).

Mastudomi *et al.* (2002) ont étudié les effets de la glycation de blanc d'œuf par des galactomannanes. De la poudre de blanc d'œuf était mise en solution avec du galactomannane à différents ratios, puis le mélange était lyophilisé, avant d'être chauffé durant 3 jours à 60°C et 65% d'humidité. Il était enfin dilué à nouveau et chauffé 30 minutes à 90°C afin d'obtenir un gel. Il a été constaté qu'à des ratios 1:8, 1:4, 1:2 et 1:1, les gels obtenus étaient plus fermes que le témoin, qui avait été soumis aux mêmes traitements mais sans avoir été mis en contact avec du galactomannane. La fermeté des gels augmentait du ratio 1:8 au ratio 1:4, mais avait tendance à diminuer au fur et à mesure que la quantité de galactomannanes augmentait (ratios 1:2 à 1:0.5) jusqu'à l'obtention de gels moins fermes que le témoin (ratio 1:0.5). Au fur et à mesure de l'avancement du temps de chauffage, l'équipe a constaté une diminution de la quantité de groupements amines libres dans le mélange blanc d'œufs-sucres tandis qu'il n'y avait pas de changements significatifs dans la poudre de blanc d'œufs. L'équipe a attribué cette

diminution du nombre de groupements amides libres à la fixation des sucres sur les groupements lysine des protéines du blanc d'œuf. Nous pouvons également supposer que cela est dû à la fixation des sucres sur les acides aminés arginine, également présents dans le blanc d'œuf (Pokora *et al.*, 2013). Ils ont également constaté une diminution du pH des mélanges, qui peut être expliquée par la libération de protons au cours de la réaction de Maillard. Ils en ont conclu que l'ajout de sucre n'avait aucun effet sur l'agrégation et la dénaturation des protéines du blanc d'œuf, et que l'amélioration des conditions de rétention d'eau par la glycation devait être due à la formation d'un réseau très fin au sein du gel. Ils ont également supposé que les propriétés gélifiantes des matrices glyquées devaient être dues à la grande capacité d'hydratation des chaînes de polysaccharides attachées aux protéines. La mesure des paramètres rhéologiques permet d'obtenir des informations quant à la structure du matériau. En effet, un balayage en température a permis d'apprécier les profils de transition solide-gel de différents mélanges. Durant la phase de chauffage, les valeurs plus importantes des modules d'élasticité G' des gels glyqués par rapport aux gels non glyqués à partir de 90°C ont été attribuées à une augmentation des interactions hydrophobes entre les chaînes protéiques au cours de la formation du gel. L'augmentation du module d'élasticité des gels glyqués durant la phase de refroidissement, toujours supérieur à celui des gels non glyqués, suggère que la structure du gel continue de se renforcer au cours du refroidissement grâce à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, présentes en nombre plus important que dans les gels non glyqués. D'autres analyses rhéologiques suggèrent une diminution des ponts disulfures au fur et à mesure que les temps de glycation augmentent (Wang *et al.*, 2020).

Zhao *et al.* (2016), ont pu observer que le module élastique G' diminuait au sein de gels contenant de l'isolat de protéines de soja glyqué avec du glucose et du maltose, ce qui suggère que la glycation aurait tendance à fragiliser la structure du gel. L'équipe a émis l'hypothèse que cela pourrait être dû à l'effet protecteur des sucres contre la dénaturation des protéines, notamment contre la chaleur. Néanmoins, l'équipe avait rajouté au sein des gels de la glucono- δ -lactone pour gélifier les protéines de soja.

Mais qu'en est-il des effets de la glycation sur la gélatine ? Bhat et Karim (2014), dont les travaux portaient sur le renforcement des propriétés mécaniques de la gélatine de poisson par ajout de sucres réducteurs, ont également constaté que les gels contenant du ribose présentaient une résistance à l'étirement plus importante que ceux n'en contenant pas (4 MPa de résistance à l'étirement pour les gels contenant du ribose, contre 2.8 MPa pour les témoins). Ils ont

également observé que le pourcentage d'élongation à la rupture des échantillons augmentait de manière significative avec la hausse de la concentration en sucres (0, 1 et 2%).

Tous ces éléments indiquent clairement que la glycation permet de renforcer les propriétés mécaniques des gels et films protéiques étudiés, qu'ils soient d'origine animale ou végétale. La glycation permet également de renforcer la texture de la gélatine, ce qui justifie le choix de cette réaction pour texturer des produits sans utiliser d'additifs.

1.1.2. Effets de la glycation à l'échelle microscopique

Les effets de la glycation sont détectables au niveau macroscopique, qu'en est-il au niveau microscopique ?

Liu *et al.* (2017), dont les travaux portaient sur la glycation d'isolat de protéines de cacahuètes avec du xylose, ont observé, par microscopie électronique à balayage (MEB), que les films à base de protéines et de sucres avaient une structure plus dense que ceux à base de protéines seules. Après 3 jours de glycation, les films présentaient une structure plus compacte et lisse qu'avant le début de la réaction. Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, la structure des gels devenait de plus en plus uniforme et lisse. Il a été observé une densification progressive de la structure des gels avec l'augmentation de la concentration en xylose, jusqu'à l'obtention, pour une concentration de xylose de 10%, d'une structure plus dense et moins hétérogène que dans les gels de concentration inférieure. Ils attribuent les effets macroscopiques de la glycation sur ces gels à ce changement de structure à l'échelle microscopique. Wang *et al.* (2020) arrivent aux mêmes conclusions par la mise en évidence, au MEB, d'un réseau plus fin, dense et uniforme des gels glyqués que des gels contenant des protéines seules ou un mélange sucre-protéines n'ayant pas été soumis à des conditions de glycation (chauffage à 60°C pendant 72h). De précédents travaux menés par l'équipe dans les mêmes conditions (Wang *et al.*, 2018) avaient permis de montrer la formation de petits agrégats dont le diamètre diminuait avec le degré de glycation des protéines. Ils pourraient prendre part à la formation d'un réseau tridimensionnel plus dense, ce qui expliquerait les observations microscopiques.

La gélatine reste une matrice, semble-t-il, plus complexe. Lors de leurs observations, Stevenson *et al.* (2019) ont mis en évidence une structure plus uniforme mais également plus poreuse des gels glyqués. Ce qui est en contradiction avec les observations de Liu *et al.* (2017) et Wang *et al.* (2020) où un réseau plus dense apparaissait après glycation.

Il semblerait donc que la glycation induise, globalement, une densification du réseau protéique des matrices, qui s'accompagne d'une homogénéisation et d'une uniformisation de la structure des gels.

1.1.3. Effets de la glycation à l'échelle moléculaire

Nous avons vu que la glycation induit des changements de l'ultrastructure des matrices protéiques, ce qui se répercute sur leurs caractéristiques macroscopiques et en particulier leur texture. Pour comprendre l'origine de ces modifications, nous allons à présent nous intéresser aux changements qu'occasionne cette réaction au niveau moléculaire.

Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction de glycation, les sucres réducteurs viennent se greffer sur les acides aminés des protéines, ce qui entraîne une diminution du nombre de groupements amines libres au sein des matrices, que l'on peut doser expérimentalement (Matsudomi *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2020). Une augmentation du poids moléculaire des protéines sur lesquelles les sucres sont venus se greffer est également observée, comme l'attestent des analyses en électrophorèse SDS-PAGE (Matsudomi *et al.*, 2002 ; Sun *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2020). Cette formation de nouvelles liaisons covalentes peut également être suivie en microspectroscopie FT-IR, comme l'ont constaté Li *et al.* (2015). Ils ont attribué la diminution progressive des absorbances associées aux groupements -OH attribués aux polysaccharides entre 3600 et 3000 cm^{-1} et aux liaisons -NH des différents pics des amides I et II (1632 et 1537 cm^{-1}), à la formation de liaisons covalentes entre ces groupes induite par la glycation. Wang *et al.* (2018) ont également pu suivre l'avancement de la glycation par cette technique, mais ont observé une augmentation de l'absorbance associée aux groupements -OH, qu'ils ont attribuée à l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles des protéines suite au greffage des sucres sur ces dernières. Bhat et Karim (2014) n'ont néanmoins pas observé de différences entre les spectres des gels contenant des sucres et n'en contenant pas.

Plusieurs auteurs ont montré que la fixation des sucres sur les chaînes protéiques a un impact sur la structure de celles-ci. Ainsi, Wang *et al.* (2020) ont constaté un changement de la structure secondaire des protéines étudiées se traduisant par une augmentation des feuillets- β intra et inter-chaînes, et une diminution des hélices- α . Sun *et al.* (2004) ont également remarqué une légère diminution de la quantité de ces deux structures dans de l'ovalbumine glyquée avec différents sucres (glucose, fructose et psicosé). Néanmoins, ces différences n'étaient pas significatives. Ces légers changements ont été attribués à la température de réaction (55°C), qui

permettrait un léger déroulement de la structure secondaire de la protéine, plutôt qu'à la fixation des sucres réducteurs. En revanche, les auteurs ont pu constater un changement partiel dans la structure tertiaire des chaînes latérales des protéines glyquées, qui a été attribué à la réaction.

Beaucoup de théories se basent sur la formation de ponts disulfures au cours de la glycation pour expliquer le renforcement de la structure des films et gels. D'après Lin *et al.* (2015), la glycation permettrait d'augmenter le potentiel d'interaction entre les chaînes protéiques et de mettre à découvert les groupements sulfhydryles (-SH) libres et les chaînes latérales hydrophobes qui les constituent. Cette même hypothèse est reprise par Liu *et al.* (2017), qui proposent un modèle explicatif à l'effet texturant de la glycation. D'après eux, la fixation du sucre à la protéine aurait tendance à entraîner son déroulement, ce qui aurait pour conséquence de mettre à découvert le cœur hydrophobe de la protéine, où se situent des groupes sulfhydryles et d'autres groupements hydrophobes. S'en suivrait la formation de ponts disulfures et la mise en place d'interactions hydrophobes entre les protéines de la matrice, ce qui confère une grande résistance au réseau. À noter que ce phénomène ne peut être transposé à la gélatine qui ne contient pas d'acides aminés soufrés (impossibilité de former des ponts disulfures).

La Figure 1 adaptée de Liu *et al.* (2017) explicite l'hypothèse de l'équipe sur les mécanismes à l'origine de l'amélioration des films d'isolat de protéines de cacahuète glyqués au xylose.

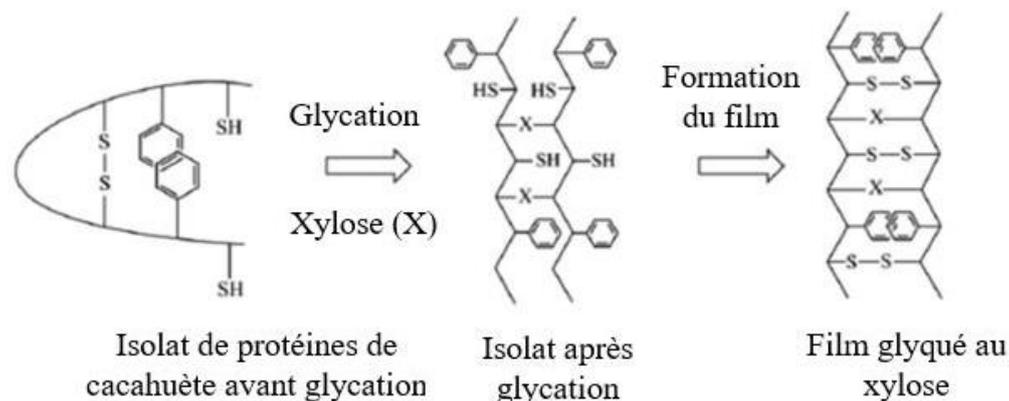


Figure 1 : Mécanismes de glycation dans des films à base de protéines d'isolat de cacahuète et de xylose (d'après Liu *et al.*, 2017)

L'hypothèse émise par les auteurs est que plus le temps de réaction est important, plus il y a de possibilité pour les sucres de se greffer aux protéines, ce qui permet aux chaînes protéiques de devenir plus mobiles et de développer le réseau du film. Cela permettrait au glycérol de se répartir uniformément dans la matrice, affaiblissant les liaisons intermoléculaires entre les protéines, ce qui occasionnerait une diminution de la force de résistance à l'étirement des gels, et une augmentation du pourcentage d'élongation des gels grâce à l'augmentation de la mobilité des chaînes (Li *et al.*, 2015).

Les mécanismes permettant d'expliquer ce qu'il se passe au niveau microscopique dans les matrices au cours de la glycation sont donc encore loin d'être élucidés. Les différentes matrices utilisées en fonction des études, ainsi que le caractère délicat de l'interprétation des spectres peuvent expliquer les résultats parfois contradictoires obtenus dans la littérature.

1.2.... Mais qui ne permet pas toujours d'obtenir l'effet texturant escompté

En fonction de la matrice et des conditions expérimentales, l'augmentation de la résistance à l'étirement n'est pas toujours accompagnée de celle du pourcentage d'élongation à la rupture. C'est le constat qu'ont fait Li *et al.* (2015) en étudiant des matrices à base d'isolat de protéines de cacahuètes glyquées avec de la gomme arabique. Les films glyqués présentaient des valeurs de résistance à l'étirement plus importantes que les gels non glyqués, bien que celles-ci aient tendance à diminuer au bout de 3 jours d'incubation à 60°C à 79% d'humidité relative, mais restaient toujours plus élevées que les valeurs relevées pour les témoins : 1.76 MPa et 1.15 MPa à 3 et 9 jours de glycation respectivement, contre 0.77 MPa pour un film non glyqué ne contenant pas de saccharides. Le pourcentage d'élongation à la rupture des films glyqués était en revanche bien inférieur à celui du témoin, bien qu'elle augmente avec la durée de glycation (37.4% et 56.2% au bout de 3 et 9 jours de glycation respectivement contre 135.7% dans un gel non glyqué).

Yang *et al.* (2021) ont travaillé sur la glycation du blanc d'œuf par du D-ribose. Le sucre était ajouté aux blancs d'œufs frais, le mélange agité, puis chauffé à 90°C au bain-marie avant refroidissement dans de l'eau glacée et stockage à 4°C. L'équipe a constaté que les valeurs de fermeté, de cohésion et de masticabilité des gels glyqués étaient significativement inférieures à celles des gels non glyqués, avec par exemple des valeurs de fermeté et de masticabilité inférieures de 30% aux valeurs des témoins, et cela même lorsque la concentration en ribose augmente. L'hypothèse proposée par l'équipe pour expliquer ce phénomène serait que le D-ribose est un bien meilleur réducteur que d'autres sucres, et qu'il était susceptible de réduire les ponts disulfures présents au sein du gel ce qui aurait pour conséquence de fragiliser la structure du gel, ces liaisons jouant un rôle important dans le maintien de sa structure. Une autre hypothèse serait que par la fixation de sucres sur les parties hydrophobes des protéines, celles-ci deviennent plus hydrophiles, ce qui a pour conséquence la diminution des interactions hydrophobes entre les protéines du réseau. Or, celles-ci jouent un rôle important dans sa

structure. Leur disparition entraînerait donc une perte des propriétés de résistance mécanique du gel.

L'adhérence du produit augmente néanmoins de manière significative avec la concentration en ribose. Elle est en effet multipliée par deux en passant de 20 à 60 mg de ribose ajoutés dans 30 mL de blanc d'œuf. Deux mécanismes peuvent expliquer cela : 1) le ribose peut former des liaisons hydrogène avec l'eau contenue dans le gel, ce qui permet de la conserver dans la matrice protéique et, 2) la formation de liaisons covalentes lors de la glycation permettrait de former un réseau plus fin et compact qui piégerait les molécules d'eau au sein de la matrice.

Des observations en MEB permettent d'observer une structure plus poreuse, granuleuse et hétérogène des gels glyqués comparativement aux témoins, qui présentent une structure beaucoup plus lisse et continue. De plus, la microstructure des gels glyqués présentait localement des zones plus compactes au niveau de structures dont on attribue l'origine à la formation d'agrégats fibreux. Ces observations sont contraires aux résultats précédemment décrits dans la partie 1.1. La glycation peut donc avoir des effets antagonistes en fonction des matrices et des conditions expérimentales.

Nous n'avons pas trouvé de publications qui s'intéressaient au fait que la glycation n'avait pas d'effet texturant dans la gélatine. Avant d'émettre des hypothèses sur l'origine de l'absence d'effet structurant de la glycation sur la gélatine, il est important de comprendre les mécanismes qui se cachent derrière ses propriétés texturales.

1.3. Caractéristiques structurales de la gélatine

1.3.1. Informations générales

La gélatine est une substance protéique obtenue par chauffage et hydrolyse du collagène présent dans la peau et les os de bœuf ou de porc, et dans les arêtes et la peau du poisson. Le collagène est une protéine fibreuse dont la structure consiste en un assemblage d'hélices de tropocollagène, elles-mêmes constituées de 3 chaînes simples, appelées chaînes alpha, riches en acides aminés tels que la glycine, la proline et l'hydroxyproline, organisées en triple-hélices (Figure 2). Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires (Duconseille *et al.*, 2015).

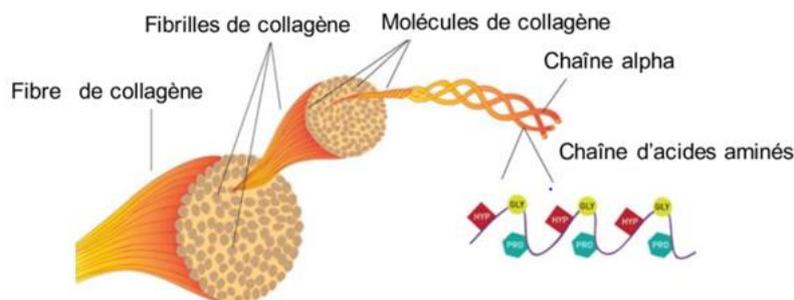


Figure 2 : Schéma de l'organisation d'une fibre de collagène (tiré de Tawrog, 2017)

La composition de la gélatine en acides aminés est illustrée par le Tableau I.

Tableau I : Composition en acides aminés de la gélatine de peau de porc (tiré de Duconseille *et al.*, 2017a)

Amino acid (%)	Origin		
	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)
Alanine	9.3	8.4	8.9
Arginine	8.9	8.5	8.2
Aspartate	6.8	7.0	7.1
Glutamate	9.8	9.7	9.8
Glycine	23.5	24.1	23.1
Histidine	0.9	0.9	0.9
Hydroxyproline	9.5	9.0	9.0
Isoleucine	1.3	1.4	1.4
Leucine	3.5	3.7	3.8
Lysine	4.4	4.7	4.7
Phenylalanine	2.6	2.7	2.8
Proline	9.5	9.6	9.9
Serine	4.0	4.2	4.1
Threonine	2.4 ^{ab}	2.3 ^a	2.7 ^b
Tyrosine	0.8	0.9	0.9
Valine	2.8	3.0	3.0

Lors du processus d'obtention de la gélatine, le collagène perd sa conformation en fibres, fibrilles et en triple-hélices et, est dénaturé de manière irréversible. Les chaînes protéiques se déroulent au cours du chauffage et se trouvent sous forme de pelotes statistiques, c'est-à-dire qu'elles sont déroulées de manière totalement aléatoire. Elles ne récupèrent que partiellement leur structure en triple-hélices au cours du refroidissement : les chaînes forment des domaines de triple-hélices séparés par des zones où les protéines sont sous forme de pelotes statistiques. Ce faisant, il se crée un réseau protéique dans lequel des molécules d'eau sont emprisonnées, ce qui forme un gel (Duconseille *et al.*, 2015). L'étape d'hydrolyse, acide ou basique, selon s'il s'agit de collagène issu de peau ou d'os (les produits en résultant sont alors qualifiés de gélatine de type A pour l'hydrolyse acide et de type B pour l'hydrolyse basique), est également à l'origine d'une hydrolyse des chaînes- α du collagène qui conduit à la formation de petits peptides (Duconseille *et al.*, 2015).

Guo *et al.* (2003) ont étudié la cinétique de formation de ces structures dans de la gélatine issue d'os (origine inconnue). D'après eux, la formation de triple-hélices se déroule en deux étapes : la nucléation, qui consiste en la formation d'un *nucleus* fait de deux chaînes- α s'enroulant ensemble pour former une double hélice, et l'enroulement, étape durant laquelle une troisième chaîne- α s'enroule autour du *nucleus* pour former une triple-hélice. En fonction de la concentration en gélatine, les noyaux peuvent se former à partir d'une même chaîne- α se repliant sur elle-même pour former une double hélice, ou de deux chaînes- α différentes. Ces replis sont qualifiés de β -turns par d'autres auteurs (Busnel *et al.*, 1989). On distingue ainsi 3 cas de figure : 1) dans des régimes dilués, les triple-hélices sont majoritairement formées de deux chaînes- α , dont une repliée sur elle-même, 2) dans des régimes concentrés en gélatine, les triple-hélices sont formées de 3 chaînes, et 3) dans les régimes semi-dilués, il y a un mélange de ces deux types d'hélices.

Les mécanismes de formation des triple-hélices sont résumés dans la Figure 3 :

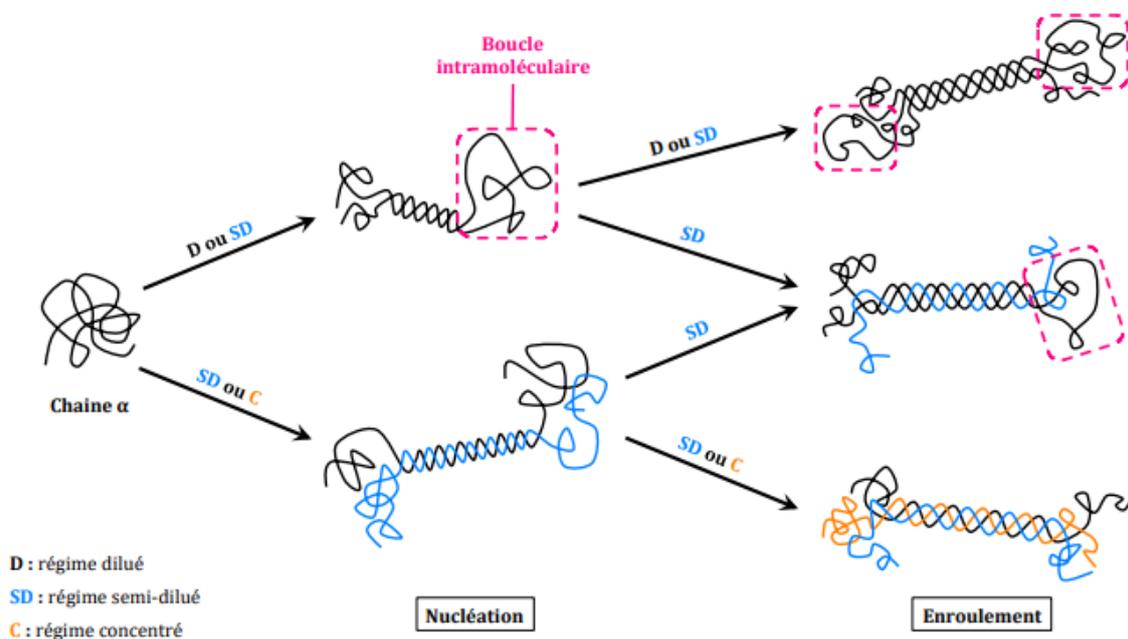


Figure 3 : Les différentes voies de formation des triple-hélices de gélatine (tiré de Portier, 2016)

Les hélices de gélatine ainsi formées sont stabilisées par des liaisons hydrogène intra et inter-chaînes, directement entre deux acides aminés ou entre deux acides aminés séparés par une molécule d'eau.

La formation de ces hélices participe à la formation d'un réseau protéique au sein du gel de gélatine (Djabourov *et al.*, 1988).

1.3.2. Interactions eau-gélatine

Il existe assez peu d'informations dans la littérature concernant la structure de la gélatine à l'état de poudre et ses interactions avec l'eau. On sait que la gélatine à l'état de poudre est sous forme semi-cristalline, c'est-à-dire qu'elle contient à la fois une phase amorphe, constituée de chaînes de gélatine déroulées, et une phase cristalline dans laquelle se trouvent des triple-hélices de gélatine seules ou assemblées en paquets (Duconseille *et al.*, 2017b).

D'après Kozlov *et al.* (1983), l'eau peut interagir de différentes manières avec la gélatine lorsqu'elle est sous forme de gel :

- En se plaçant à l'intérieur des hélices pour les stabiliser par formation de liaisons hydrogène ;
- En stabilisant les triple-hélices par l'extérieur en formant des liaisons hydrogène avec les groupes polaires des chaînes de gélatine ;
- En formant des couches dites "polymoléculaires" qui correspondent à plusieurs épaisseurs de couches d'eau superposées ;
- Elle est également présente sous forme d'eau libre.

L'humidité de la gélatine aurait une influence sur sa structure, du fait des interactions ayant lieu entre l'eau et la gélatine (Duconseille *et al.*, 2015). D'après Levine et Slade (1988), l'eau joue un rôle de plastifiant dans les régions amorphes de la poudre de gélatine, ce qui apporte une plus grande mobilité aux chaînes protéiques, et interagit également avec la phase cristalline. L'humidité de l'air, combinée à la température ambiante, peut avoir une influence sur la structure et la mobilité de l'eau dans la poudre. Les travaux de Duconseille *et al.* (2017b), qui portaient sur des gélatines sous forme de poudre à 12% d'humidité placées à vieillir pendant 4 semaines dans des chambres climatiques à 50°C avec une humidité de 80% environ, ont ainsi montré que le vieillissement de la gélatine engendre une diminution de la structure cristalline de la poudre, ce qui se traduit par une diminution de la quantité de triples hélices dans la gélatine due à leur déroulement. L'équipe a également montré que la mobilité de l'eau augmente suite au vieillissement de la gélatine, ce qui serait dû soit à l'absorption d'eau par la matrice soit à un relargage d'eau dans la phase amorphe suite à la perte d'une partie de la structure cristalline de la gélatine.

La structure de la gélatine a également une influence sur sa capacité à absorber de l'eau. Ainsi, d'après Kozlov et Burdygina (1983), dont les travaux portaient sur des films de gélatine, plus

les gels de gélatine contiennent d'hélices, plus ils sont capables d'absorber l'eau dans l'air ambiant, pour des pressions partielles de vapeur d'eau allant jusqu'à 90%. Cette quantité d'hélices est à rattacher au Bloom des gélatines. En effet, Bigi *et al.* (2004) ont montré qu'il existe une relation linéaire entre le degré Bloom des gélatines et la quantité de triple-hélices qu'elles contiennent : plus le Bloom est important, et plus il y a de triple-hélices. Cela peut être expliqué par le mode d'obtention des gélatines de différents Blooms. En effet, selon Portier (2016), le processus d'obtention de la gélatine de type A à partir du collagène consiste à faire tremper les peaux dans différents bains acides successifs de températures croissantes comprises entre 55 et 100°C. Ces conditions de température et d'acidité conduisent à une hydrolyse du collagène. La gélatine extraite à 55°C contient les chaînes protéiques les plus longues qui donneront les gels les plus résistants (Bloom élevé). Le Bloom désiré est obtenu par mélange des différentes fractions d'extraction. Ainsi, plus le Bloom des gélatines est important, plus les chaînes protéiques présentes dans la gélatine sont longues, et plus elles seront susceptibles de former des hélices, car il faut une longueur minimale de chaîne pour que les hélices formées soient stables d'après Guo *et al.* (2003). Les propriétés mécaniques des gels sont également à relier directement à la quantité d'hélices qui les constitue. Ainsi, d'après Bigi *et al.* (2004), plus un gel contient de triple-hélices, plus il est rigide/résistant.

Au cours des pré-essais que nous avons réalisés, nous avons pu constater que d'une journée à l'autre, pour des manipulations réalisées dans les mêmes conditions (lots de gélatine identiques, pesées au centième de gramme près, mêmes temps et température de réaction), nous obtenions des résultats différents, avec des gels glyqués parfois plus fermes que les gels non glyqués d'après les mesures de TPA, et parfois moins fermes. Nous en avons donc déduit qu'il devait y avoir un ou plusieurs facteurs environnementaux influençant nos résultats. Deux facteurs ont été retenus : l'humidité ambiante et les UV, car entre le moment où la gélatine était pesée et dissoute pour former une solution, il y avait un délai d'environ 15 minutes durant lequel elle restait sur la paille, à l'air libre. Pour des raisons de temps, nous avons décidé de ne nous concentrer que sur un seul facteur, et avons choisi l'humidité.

Le peu d'informations dont on dispose dans la littérature laisse à penser que l'humidité a une influence sur la structure de la gélatine. On peut supposer que l'eau, peut-être en déroulant les triple-hélices, ou en interagissant avec les acides aminés des chaînes de gélatine, facilite ou empêche l'accès des sucres aux chaînes de gélatine pour former des liaisons covalentes au cours

de la réaction de glycation. En conséquence, la glycation n'occasionnerait pas toujours un renforcement de la structure, et par conséquent des propriétés mécaniques des gels.

Il peut également être intéressant de déterminer si le Bloom de la gélatine utilisée a un effet sur la capacité de la glycation à texturer les gels, étant donné que ce paramètre traduit leur résistance mécanique et est directement lié à leur structure. Ainsi, ce rapport tentera de répondre à la question suivante : **L'humidité initiale et le degré Bloom de la gélatine ont-ils un effet sur les propriétés de texturation de la réaction de glycation ?**

2. Matériel et méthodes

On suppose que le degré Bloom de la gélatine, ainsi que son humidité lorsqu'elle est sous forme de poudre, avant sa dissolution pour former un gel, ont un effet sur la propension de la glycation à modifier les propriétés mécaniques des gels.

L'objectif est donc de déterminer l'effet de l'humidité et du Bloom de la gélatine sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des gels étudiés, et de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre ces facteurs, la glycation et le Bloom. On utilisera pour cela une approche multi-échelle.

2.1. Préparation des gels

Les gels testés sont composés de gélatine de type A provenant de peau de porc, 125 et 200-Bloom, (Caldic Ingredients, Rognac, France), d'humidités respectives initiales 12.6% et 14%. L'humidité de ces poudres a été déterminée en pesant environ 5 grammes de gélatine dans des coupelles en aluminium de masse connue m_C à l'aide d'une balance de précision (Mettler Toledo AB204-S/FACT) et en les plaçant à l'étuve à 105°C pendant 24h. Elle est déterminée selon le calcul suivant :

$$\text{humidité (en \%)} = \frac{m_{C+G} \text{ avant séchage} - m_{C+G} \text{ après séchage}}{m_{C+G} \text{ avant séchage} - m_C} \times 100$$

Avec $m_{C+G} \text{ avant séchage}$ la masse de la capsule et de la gélatine avant leur passage à l'étuve et $m_{C+G} \text{ après séchage}$ leur masse après leur passage à l'étuve. Toutes les masses sont en grammes, avec une précision de 0.1 mg.

On se place à pH=9 en utilisant une solution de tampon TRIS (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol) à 1 M (Trizma® Pret-set crystals, Sigma Aldrich).

On souhaite travailler avec des gélatines ayant des humidités significativement différentes pour mettre en évidence un effet de l'humidité sur la glycation. On place une partie des poudres de gélatine 125 et 200-Bloom dans des conditions desséchantes, et le reste dans des conditions humides, en utilisant des dessiccateurs contenant respectivement du gel de silice ou une quantité d'eau en large excès par rapport à la gélatine. Les dessiccateurs sont scellés et placés dans le noir durant 10 jours pour éviter un quelconque biais induit par les UV. On qualifie les gélatines placées en conditions humides de gélatines "humides" et celles placées en conditions desséchantes de gélatines "sèches". Leur taux d'humidité après passage dans ces conditions est de 5% pour les gélatines "sèches" et 25-30% pour les gélatines "humides" (25% pour les gélatines 125-Bloom et 30% pour les gélatines 200-Bloom). On considère que les gélatines à 25 et 30% d'humidité sont des conditions d'humidité comparables, car la différence d'humidité entre ces deux gélatines est assez faible, et 25% d'humidité reste une valeur très éloignée du 5% d'humidité des gélatines "sèches".

L'expérience a été réalisée selon le plan d'expérience suivant (plan à 3 facteurs à 2 niveaux chacun) (Tableau II). On associe un numéro de groupe à chaque condition qui facilitera la compréhension lors du traitement des résultats dans la partie 3.3.

Tableau II : Plan d'expérience

Catégorie d'échantillon	Groupe	Bloom	Humidité	Glycation
B200 H G	G1	200	H	G
B200 H NG	G2	200	H	NG
B200 S G	G3	200	S	G
B200 S NG	G4	200	S	NG
B125 H G	G5	125	H	G
B125 H NG	G6	125	H	NG
B125 S G	G7	125	S	G
B125 S NG	G8	125	S	NG

B200 : gélatine 200-Bloom ; B125 : gélatine 125-Bloom ; H : gélatine dite "humide" ; S : gélatine dite "sèche" ; G : gels glyqués ; NG : gels non glyqués.

On réalise 3 répétitions pour chaque condition.

La teneur en eau du gel a été fixée à 3 kg d'eau/kg de matière sèche, et la concentration en D-ribose (Sigma Aldrich, 3.7% d'humidité) à 7% de la masse totale de gélatine ajoutée. Le récapitulatif des quantités à peser est présenté dans le Tableau III.

Tableau III : Récapitulatif des pesées

	Gélatine 200-Bloom Humide/Sèche		Gélatine 125-Bloom Humide/Sèche	
	Condition non glyquée	Condition glyquée	Condition non glyquée	Condition glyquée
Solution de TRIS à 1 M (g)	19.52	21.12	19.97	21.57
Gélatine (g)	8	8	8	8
Ribose (g)		0.56		0.56

Les calculs ont été réalisés en se basant sur les humidités respectives des gélatines avant leur placement en conditions très desséchantes ou très humides, car la détermination de la teneur en matière sèche a été effectuée en même temps que le protocole d'obtention des gels. Si nous avions voulu obtenir ces valeurs avant de lancer la fabrication des gels, cela aurait nécessité d'attendre une semaine supplémentaire que les gels se remettent à l'équilibre, car l'ouverture des dessiccateurs aurait entraîné une perturbation de l'équilibre de l'humidité des gels.

Les gels sont préparés selon le protocole suivant :

- Introduction du tampon dans des tubes en plastique de 50 mL et chauffage sous agitation (agitateur rotatif, Tube Revolver, Thermo Scientific, Allemagne) à 50°C ;
- Ajout de la gélatine petit à petit et attente jusqu'à dissolution complète ;
- Ajout du sucre (si nécessaire) et incubation 3h à 50°C ;
- Coulage des gels dans les moules adaptés aux mesures de rhéologie (cylindres de 40 x 1 mm), de texture (cylindres de 20 x 10 mm) et à la préparation des échantillons de microscopie (cylindres de 10 x 20 mm). Les moules sont préalablement placés sur une plaque refroidie avec de la glace. Une fois remplis, ils sont conservés à 4°C.

L'Annexe 1 présente un aperçu des gels glyqués et non glyqués obtenus.

2.2. Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission consiste à bombarder un échantillon avec un faisceau d'électrons et à détecter les électrons étant parvenu à le traverser. Cela nécessite de réaliser des coupes ultra-fines pour que les électrons parviennent à traverser l'échantillon. Les résultats obtenus renseignent sur la structure de l'échantillon et nous donnent des informations à l'échelle du nanomètre (Loisel, 2021).

Les échantillons de gélatine sont d'abord fixés dans la résine *via* un protocole se déroulant en 5 grandes étapes :

Étape 1 : Prélèvement-fixation : Les échantillons sont coupés en 4 et placés dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5% dans une solution de tampon cacodylate à 0.1M pH=7.4. Cette étape permet de fixer les protéines contenues dans les échantillons.

Étape 2 : Post fixation : Les échantillons sont coupés en petits morceaux de 1 mm sur 0.5 mm environ, rincés dans une solution de cacodylate (à 0.1M pH=7.4) puis post-fixés dans du tétroxyde d'osmium à 1%. Cette solution permet de fixer les lipides contenus dans l'échantillon (peu présents dans notre cas), et permet d'améliorer le contraste de l'image observée au microscope.

Étape 3 : Déshydratation : Cette étape consiste à remplacer progressivement l'eau contenue dans l'échantillon par de l'alcool, puis de l'oxyde de propylène (bains successifs dans de l'eau pure, de l'éthanol à 70°, puis à 95° et à 100°, et de l'oxyde de propylène).

Étape 4 : Imprégnation : L'oxyde de propylène contenu dans l'échantillon est remplacé par de la résine (passage de l'échantillon dans un mélange oxyde de propylène résine de ratio 1:1, puis dans la résine pure).

Étape 5 : Inclusion : Les échantillons sont déposés dans des moules remplis de résine. Les moules sont ensuite placés à l'étuve 2h à 37°C puis 48h à 60°C afin que la résine polymérise.

Des coupes semi-fines (environ 1 μm d'épaisseur) et ultra-fines (environ 90 nm) des échantillons sont ensuite réalisées avec un ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut E). On colore les coupes semi-fines avec une solution de bleu de toluidine, capable de traverser la résine et de mettre en évidence les protéines. Les coupes ultra-fines sont immergées dans des solutions de contrastants (solution d'acétate d'uranyle à 7% et de nitrate de plomb et de citrate trisodique).

Les mesures ont été réalisées au Centre d'Imagerie Cellulaire et Structural (CICS) de l'Université Clermont-Auvergne avec un microscope électronique en transmission Hitachi H7650 couplé à une caméra Hamamatsu.

2.3. Spectroscopie FT-IR

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

Des coupes de 6 μm ont été réalisées au cryotome (Leica CM1950, Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne) pour être analysées en microspectroscopie IR. Des essais en spectroscopie sur des coupes de 10 μm nous avaient permis d'observer une saturation du signal due à une épaisseur trop importante des coupes, d'où le choix d'une épaisseur de 6 μm .

Les coupes de 6 μm ont été placées sur des lames BaF₂ circulaires de dimensions 13x1 mm (Crystran Limited, Poole, Royaume-Uni), adaptées aux analyses en spectroscopie IR, et laissées à sécher à l'air libre. Elles ont ensuite été analysées en spectroscopie IR grâce à un spectromètre Nicolet iN10 (Thermo Scientific). Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel OMNIC Picta (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA). Les paramètres d'acquisition étaient les suivants : acquisition des spectres en transmission, avec un détecteur refroidi, fenêtre d'acquisition de 30x30 μm , résolution d'acquisition de 2 cm^{-1} , sur l'intervalle 4000-675 cm^{-1} . Pour chaque coupe, 30 spectres correspondant à 30 points différents sur la coupe ont été acquis, avec 64 balayages par spectre. Le spectre du bruit de fond a été tracé à partir de 128 balayages.

Les prétraitements des spectres ont été réalisés sur les logiciels Excel 2016 et "The Unscrambler" (version 9.8, CAMO Software). Il s'agit des traitements suivants : correction de ligne de base, normalisation, dérivées secondes des spectres en utilisant la méthode de Stavitzky-Golay avec 7 points de lissage et un polynôme d'ordre 2.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées sur le logiciel "The Unscrambler" afin de discriminer les nombres d'ondes dont les absorbances variaient d'une modalité à l'autre. Ensuite, les valeurs moyennes des dérivées secondes des absorbances d'intérêt ont été comparées par des tests de Student.

2.4. Mesures des propriétés mécaniques

Pour caractériser les effets de la glycation sur les propriétés mécaniques des gels en fonction des différentes conditions expérimentales appliquées, nous réalisons des mesures texture et de rhéologie.

2.4.1. Mesures de texture (Texture Profile Analysis)

Pour caractériser la structure des gels, nous utilisons la méthode de Texture Profile Analysis (TPA). Cette méthode consiste à appliquer, à deux reprises, une déformation sur un échantillon, comme pour simuler une action de mastication. On mesure la force nécessaire à cette déformation tout au long du procédé, et celle-ci nous permet de déterminer différents paramètres relatifs au produit : la fermeté, l'élasticité, l'adhérence, la cohésion et la masticabilité.

Les mesures sont réalisées sur un texturomètre (EZ-Test LX, Shimadzu, Noisiel, France), dans les conditions suivantes : échantillon cylindrique de 20 mm de diamètre, sonde de compression de 50 mm de diamètre, détection de surface à 0.5 N, vitesse de déplacement de 20 mm/min et double compression à 50% de la hauteur de l'échantillon.

Les échantillons de gel ont été conditionnés à 4°C pendant 2 heures pour assurer une gélification optimale, puis placés à température ambiante 2 heures avant la réalisation des mesures.

2.4.2. Rhéologie

Le comportement rhéologique des gels obtenus est déterminé à l'aide d'un rhéomètre HAAKE MARS iQ Air (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une géométrie plane (plan-plan) striée de 35 mm de diamètre, avec un entrefer de 1 mm. La température des échantillons est régulée à 20°C ± 1°C grâce à un système à effet Peltier. On effectue un balayage en déformation entre 0.1 et 1000% de déformation à une fréquence de 1 Hz. On relève les valeurs de contrainte de cisaillement au croisement des modules viscoélastiques (τ -croisement), la valeur du module élastique dans le domaine viscoélastique linéaire (G' max) et la contrainte de cisaillement à la fin du domaine viscoélastique linéaire (τ -fin-LVR). Les correspondances entre ces paramètres et la structure des gels sont détaillées dans la partie 3.3.2.

Un algorithme a été réalisé, au sein du laboratoire, pour calculer les plateaux de LVR. On détecte la fin de ce plateau lorsque le pourcentage de la pente varie de plus de 3%.

2.5. Traitements statistiques

Des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées sur les logiciels "The Unscrambler" (version 9.8, CAMO Software) et Statistica (version 14.0.0.15, TIBCO Software Inc). Des tests de Student ont été effectués sur Excel (version 2016) avec un risque α de 5%.

3. Résultats et discussion

3.1. Microscopie électronique en transmission

La Microscopie Électronique en Transmission (MET) est une méthode peu utilisée pour l'étude de gels de gélatine car souvent peu accessible aux laboratoires, l'essentiel des observations se fait donc par Microscopie Électronique à Balayage (MEB). La MEB a l'inconvénient de permettre uniquement l'observation de la surface de l'échantillon alors que la MET, après une préparation spécifique des échantillons destinée à préserver leur structure, permet d'accéder à des informations sur l'ultrastructure et d'obtenir une meilleure résolution. Ceci est essentiel dans le cas de notre étude afin de pouvoir d'une part, observer la présence ou non d'un réseau induit par la réaction de glycation et d'autre part, de déterminer un éventuel effet de l'humidité initiale et du Bloom de la gélatine sur son ultrastructure. Les échantillons observés ont été comparés selon 3 modalités : le Bloom (125 ou 200), l'humidité initiale de la poudre de gélatine mesurée en amont de la préparation des gels (5 et 25%) et la présence ou non de ribose (0 ou 7%) destinée à initier une réaction de glycation.

L'Annexe 2 A, B montre une différence très nette d'aspect du gel en fonction du Bloom de la gélatine. L'ultrastructure du gel est très homogène pour le Bloom 125 alors qu'un ensemble d'agrégats ayant l'apparence d'un réseau ou d'un maillage est visible pour le Bloom 200 en condition initiale humide (25%) pour les gels non glyqués (sans ribose) qui correspondent à notre condition témoin (gélatine + tampon). Etxabide *et al.* (2015) ont observé des structures similaires en réalisant des observations en microscopie à force atomique sur des gels de gélatine de poisson à des résolutions identiques à celles utilisées pour l'Annexe 2 A et B. Ils affirment que ces structures, qu'ils qualifient de "structures fibrillaires" correspondent aux structures en triple-hélices présentes dans la gélatine. Nous émettons donc l'hypothèse, en nous basant sur ces données, que les agrégats observés en MET correspondent également à des triple-hélices de gélatine. Les différences observées entre les Blooms peuvent être expliquées par la quantité plus importante de triple-hélices présentes dans les gels B200 que B125 en raison de leur procédé d'extraction (Bigi *et al.*, 2004 ; Portier, 2016).

Lorsque la gélatine est humide (25%) et en présence de ribose, un ensemble d'agrégats ayant l'apparence d'un réseau apparaît dans la gélatine 125-Bloom (Annexe 2 C) alors que ce n'est pas le cas en condition d'humidité basse (5%) (Annexe 2 D). En absence de ribose en condition sèche, ce phénomène d'agrégation n'est pas observé (Annexe 2 E) et les agrégats visibles pour la gélatine 200-Bloom en condition initiale sèche (sans ribose) sont beaucoup plus ténus voire quasi inexistantes (Annexe 2 F) par rapport à la condition initiale humide (Annexe 2 B). Une des hypothèses pouvant être formulée serait que le ribose est bien responsable de la formation de liaisons intermoléculaires lors de la réaction de glycation, ce qui conduit à la formation d'agrégats, comme l'avaient observé Etxabide *et al.* (2015) suite à la glycation de gélatine de poisson avec du lactose, mais que les sites réactifs (fonctions amines de résidus d'acides aminés) seraient plus accessibles dans le cas d'un gel à 125-Bloom humide (25%) pour 2 raisons. La première serait que la "densité" du gel B200 ne permettrait pas au ribose d'accéder aux sites réactifs. En effet, Kuai *et al.* (2020) ont montré que des gels avec des valeurs de Bloom élevées ont plus de structures en triple-hélices et de chaînes protéiques de haut poids moléculaire enchevêtrées entre elles, ce qui limite les interactions possibles entre la gélatine et des composés ajoutés (polyphénols dans leur cas). La deuxième raison serait qu'une humidité initiale élevée de la gélatine déroulerait les triple-hélices de gélatine, comme constaté par Duconseille *et al.* (2017b) lors de leurs travaux sur de la gélatine vieillie, ce qui permettrait de mettre à découvert les chaînes latérales des acides aminés polaires des chaînes- α impliqués dans la réaction de glycation, comme la lysine et l'arginine. On ne peut cependant pas affirmer que l'humidité seule ait conduit à ces changements de structure dans les travaux de Duconseille *et al.* (2017b), la gélatine en poudre ayant été chauffée à 50°C au cours de ces travaux. Si cette deuxième raison semble être applicable à la gélatine 125-Bloom, elle explique difficilement la moindre présence d'agrégats dans la gélatine 200-Bloom en condition sèche par rapport à la condition humide. Les effets de l'humidité sur les gels dépendent peut-être de leur Bloom.

Les comparaisons basées sur les humidités initiales des gélatines permettent de confirmer les observations et hypothèses mentionnées ci-avant. Pour les gélatines 125-Bloom, les gels sans ribose ne présentent pas de différences visibles quelle que soit l'humidité initiale (Annexe 2 A, E). Par contre, en présence de ribose, l'ultrastructure des gels est très différente. Un ensemble d'agrégats est nettement visible lorsque l'humidité initiale est élevée (Annexe 2 C) et totalement absent lorsque l'humidité initiale est basse (Annexe 2 D). Cette observation irait dans le sens d'une structure moins dense, où les fonctions amines des acides aminés seraient plus accessibles pour le ribose à des humidités élevées. Pour le gel 200-Bloom, un ensemble d'agrégats structuré

est nettement visible en l'absence de ribose et à humidité élevée (Annexe 2 G) contrairement à la condition sèche (Annexe 2 H) confirmant ainsi que le traitement nécessaire pour obtenir un Bloom déterminé ou le conditionnement à une humidité élevée, ont eu un effet sur son ultrastructure. Cependant, en présence de ribose et quelle que soit l'humidité, aucun ensemble d'agrégats structuré n'est visible dans les gels 200-Bloom (Annexe 2 I, J). Ceci va dans le sens d'une difficulté d'accès du ribose au travers du gel 200-Bloom.

En combinant ces observations avec les résultats obtenus en FT-IR (*cf.* 3.2), on peut supposer que la présence de ribose modifie les liaisons intra- et/ou intermoléculaires au sein des hélices en entraînant la rupture de liaisons hydrogène par exemple, ce qui entraînerait une disparition des agrégats. En effet, on sait que les triple-hélices sont stabilisées par des liaisons hydrogène intra et inter-chaînes (*cf.* 1.3.1). Selon Gonzalez et Wess (2013), ces liaisons hydrogène se forment avec toute chaîne latérale d'acides aminés polaires disponibles. Il s'agit des groupes chargés des chaînes latérales d'acides aminés tels que les lysines, arginines, glutamates et aspartates des groupes hydroxyle des chaînes latérales de la sérine, de la thréonine et de l'hydroxylysine. Étant donné que les acides aminés principalement impliqués dans la réaction de glycation (lysine et arginine), ainsi que ceux mis en évidence par Fortune (2021), à savoir la sérine et la thréonine sont susceptibles de former des liaisons hydrogène, il est possible que pour les Blooms les plus élevés où le réseau protéique est plus dense, le ribose entre indirectement en compétition avec les liaisons hydrogène à cause d'un encombrement stérique trop important. Ce genre de phénomène avait été mis en évidence par Kuai *et al.* (2020) qui avaient observé que des groupes hydroxyles et amines de molécules de polyphénols et des nanoparticules chargées de chitosane (polyoside) pouvaient former des liaisons hydrogène avec les chaînes de gélatine et ainsi interférer avec une structure en triple-hélices. Cette hypothèse confirmerait nos observations au MET pour la gélatine 200-Bloom, à savoir que quelle que soit l'humidité initiale de la gélatine, on n'observe aucun ensemble d'agrégats. Il se peut que le ribose agisse de la même façon en perturbant la structure des triple-hélices en fonction de l'humidité de la gélatine, à la fois à cause de l'humidité au cours de glycation ($3 \text{ kg}_{\text{eau}}/\text{kg}_{\text{MS}}$) mais également en fonction de l'humidité de la poudre de gélatine avant l'expérimentation (5 ou 25% dans notre cas).

Une autre hypothèse serait que le ribose se fixerait, de manière covalente, sur un acide aminé et de ce fait, empêcherait le ré-enroulement des triple-hélices. Ceci maintiendrait une structure déroulée avec une proportion plus élevée de phase amorphe, et donc une absence d'agrégats pouvant être observés. Si cette hypothèse est en adéquation avec les observations de gélatine

200-Bloom au MET, elle est contradictoire avec la présence d'agrégats observés dans la gélatine 125-Bloom humide glyquée.

Nous constatons que l'observation d'agrégats dans les gels varie en fonction du grossissement utilisé. En effet, des agrégats sont visibles sur les gels 125-Bloom non glyqués en condition humide (Annexe 2 K) mais, uniquement à un grossissement nettement supérieur à celui de la Annexe 2 A (x 200000 Annexe 2 K contre x 70000 sur la Annexe 2 A). La taille des agrégats semble donc varier en fonction des conditions expérimentales.

3.2.Spectroscopie FT-IR

Une première Analyse en Composantes Principales (ACP) nous a permis de constater que l'une des répétitions de l'échantillon de gélatine Bloom 200 glyquée était systématiquement à part, ce qui avait tendance à tirer les résultats de l'ACP dans une direction. Nous avons supposé que ce résultat aberrant était dû, soit à une surépaisseur de la coupe, soit à un problème de lame sale. Nous avons donc choisi de ne pas inclure les données issues de cette répétition dans les traitements statistiques.

Nous réalisons une correction de ligne de base et normalisons les spectres obtenus avant de calculer les dérivées secondes des valeurs moyennes des spectres (*cf.* Annexe 3 et Annexe 4).

Une seconde ACP, basée sur les valeurs obtenues, a mis en évidence des différences entre les échantillons au niveau des pics correspondant aux sucres et aux pics des amides I et II qui sont associés aux protéines. Nous nous sommes donc intéressés aux différences entre les spectres obtenus dans ces trois zones. On retient les bandes suivantes : 1200-900 cm^{-1} pour les sucres, 1750-1600 cm^{-1} pour l'amide I et 1599-1485 cm^{-1} pour l'amide II, en se basant sur les pics majoritaires issus de la littérature, dont les bornes diffèrent en fonction des études, et de nos observations sur des spectres non transformés.

Les ACP effectuées sur ces 3 bandes permettent de mettre en évidence une séparation des échantillons en fonction de leur caractère glyqué ou non et de l'humidité initiale de la gélatine. Nous observons ainsi 4 groupes distincts en fonction de chaque modalité (*cf.* Annexe 5 et Annexe 6). Cela indique que l'ajout de ribose induit des changements au niveau des spectres des sucres et des amides I et II, tout comme l'humidité initiale de la gélatine. Ces premières indications laissent à penser que l'ajout de sucre est détectable par FT-IR et a une incidence sur les vibrations des fonctions chimiques des protéines du gel. L'humidité, que l'on sait influencer

la structure de la gélatine (Duconseille *et al.*, 2017b), pourrait également avoir un effet sur la structure des gels du fait de son impact sur les pics des protéines.

Pour vérifier la significativité de ces observations, on effectue des tests de comparaison des moyennes (tests de Student) des dérivées secondes des absorbances correspondant à chaque nombre d'onde des bandes. Les tests permettent de comparer les conditions opératoires 2 à 2.

Dans le cas des comparaisons entre degrés Bloom, aucune différence significative n'est observée, ce qui signifie que le Bloom n'affecte pas les vibrations/déformations des liaisons chimiques présentes dans les bandes amides I et II ainsi qu'au niveau de la bande identifiée comme étant propre au ribose. Cela est contradictoire avec les observations en MET où des différences très nettes avaient pu être observées. Il est possible que cela soit dû à un problème d'échelle : la structure chimique des 2 polymères est la même mais la densité de la structure à un Bloom élevé serait visible en MET sous forme d'agrégats. À noter que des différences significatives sont observées au niveau de valeurs d'absorbance en dehors des zones précédemment sélectionnées, ce qui peut vouloir dire qu'il y a tout de même des différences entre les Blooms, mais dans d'autres zones d'intérêt. Elles ne seront néanmoins pas étudiées dans le cadre de ce mémoire.

Les moyennes des absorbances relatives aux nombres d'ondes suivants (Tableau IV) sont significativement différentes lorsqu'on compare 2 à 2 les conditions opératoires.

Tableau IV : Nombres d'ondes (en cm^{-1}) caractéristiques en fonction des différences significatives observées entre les absorbances

Sucres	Amide I	Amide II
1149	1687	1558
1120	1681	1556
1099	1662	1532
1087	1660	1456
1081	1658	
1064	1639	
1039	1623	
1014		

Toutes les correspondances entre les nombres d'ondes relevés et des groupements caractéristiques mentionnés dans la littérature ont été recensées dans le tableau présenté en Annexe 7. À noter que pour les nombres d'ondes qui touchent à la structure secondaire en feuillets- β , dans le pic de l'amide I, notamment à 1623, 1630, 1687 cm^{-1} , la littérature n'est pas unanime sur la présence de ces structures au sein de la gélatine. Pour notre part, nous considérons que la structure de la gélatine est essentiellement composée de triple-hélices, donc nous n'interpréterons pas les variations d'absorbance liées à ces nombres d'ondes.

Nous avons ensuite comparé deux à deux les différentes conditions expérimentales.

Tableau V : Comparaison des nombres d'ondes (en cm^{-1}) significativement différents en fonction des conditions expérimentales

A		B		C		D	
Condition glyquée / non glyquée		Humidité		GS/GH		NGS/NGH	
Sucres	Amides	Sucres	Amides	Sucres	Amides	Sucres	Amides
1014	1456	1014	1456	1039	1623	1014	1456
1039	1556	1039	1556	1064		1039	1556
1081	1558	1064	1558	1081		1064	1558
1087	1623	1087	1623	1087		1087	1623
1087	1623	1099	1639	1149		1099	1658
1120			1658			1120	1687
1149			1660				
			1687				

Comparaison conditions glyquée /non glyquée (Tableau V A) :

L'ajout de ribose induit des changements au niveau de certains nombres d'ondes :

- au niveau des sucres, pour le nombre d'ondes 1039 cm^{-1} , qui correspond à la formation de liaisons covalentes entre le ribose et les groupements amine du collagène (cf. Annexe 7), une absorbance moyenne significativement différente est observée entre les deux conditions glyquée et non glyquée ;
- le même phénomène est observé à 1081 cm^{-1} , ce qui témoigne de l'accumulation de produits de glycation dans le gel.

En se basant sur nos observations au MET, nous constatons la présence d'agrégats dans les gels 125-Bloom humides glyqués, ce qui pourrait indiquer que les différences observées seraient le signe d'une augmentation de la quantité de liaisons covalentes avec le ribose.

La littérature indique qu'à $1556\text{-}1558$ et 1623 cm^{-1} le collagène natif est à la fois sous forme d'hélices et déroulé. La gélatine étant du collagène dénaturé, il est possible que ces pics caractéristiques de la structure du collagène ne correspondent pas à ceux de la gélatine. Néanmoins, si cela était le cas, les pics mentionnés étant significativement différents entre les conditions glyquées et non glyquées, cela signifierait que la glycation induit un changement de structure de la gélatine, ce qui confirmerait nos observations en MET.

Comparaison conditions Sèche / Humide (Tableau V B) :

Nous observons une différence significative des absorbances à 1039 cm^{-1} . Nos observations au MET pour la gélatine 125-Bloom humide glyquée montrent la formation d'agrégats. Ceci permet de penser qu'il y a plus de liaisons covalentes dans ce gel.

L'humidité initiale a une influence sur la structure de la gélatine comme en témoignent les différences significatives dans la bande de l'amide I. Le nombre d'onde à 1639 cm^{-1} correspond à la vibration de la liaison C=O de l'amide I. Les différences significatives aux nombres d'ondes $1556\text{-}1558$ et 1623 cm^{-1} laissent à penser que, comme pour les conditions glyquée/non glyquée, l'humidité induit des modifications au niveau de la structure des hélices. Le nombre d'onde 1660 cm^{-1} est caractéristique de la conformation en triple-hélices du collagène I, qui est majoritaire dans les gels de gélatine étudiés. Néanmoins, cette structure est fortement perturbée durant le procédé d'extraction de la gélatine, ainsi que lors de la préparation du gel avec les étapes de chauffage/ refroidissement. Ces hélices se reforment de manière partielle au cours du refroidissement de la gélatine, si bien qu'il est difficile d'évaluer l'impact de nos conditions opératoires sur ces structures.

Une hypothèse serait que les structures en hélices seraient plus ou moins dépliées en fonction de l'humidité.

Comparaison conditions glyquée sèche / glyquée humide (GS/GH) (Tableau V C) :

Nous observons que la bande à 1623 cm^{-1} est significativement différente entre les conditions glyquées sèche et glyquée humide. Cela confirme donc l'influence de l'humidité sur la structure de la gélatine. Comme évoquée précédemment, ce nombre d'ondes peut être attribué à la structure déroulée du collagène, mais certains auteurs évoquent aussi que cette longueur d'onde peut être un marqueur de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires (Lefèvre et Subirade, 2000). Nos observations au MET montrent une formation d'agrégats plus importante pour la gélatine B125 humide, ce qui tendrait à confirmer la présence accrue de liaisons hydrogène modifiant la structure de ces gels.

Comparaison conditions non glyquée sèche / non glyquée humide (NGS/NGH) (Tableau V D) :

Nous remarquons que pour les pics des amides, il y a beaucoup plus de nombres d'ondes qui présentent des différences d'absorbance significatives en condition non glyquée qu'en condition glyquée, quelle que soit l'humidité. Ceci montre que la glycation a bien une influence sur la structure. Nous observons que les pics des sucres varient également en condition non glyquée, ce qui peut paraître contradictoire avec ce que nous avons précédemment évoqué. Néanmoins, nous savons que la gélatine contient des résidus de sucres, il est donc tout à fait

possible que les variations observées en condition non glyquée soient significatives, mais à des niveaux très bas et qui dépendraient directement de la composition de la matrice.

3.3. Mesures des propriétés mécaniques

Une ACP globale sur l'ensemble des données issues des mesures de texture et de rhéologie (Annexe 8) nous permet de remarquer une séparation des échantillons en 8 groupes distincts en fonction des combinaisons des différentes variables qui leur sont associées (Tableau II). Il est donc possible de différencier très nettement les différentes conditions opératoires, ce qui signifie que le protocole expérimental a été respecté et que les différentes conditions sont bien discriminantes (taux d'humidité, Bloom, ajout de ribose ...)

3.3.1. Mesures de texture

Pour mémoire, la mesure de TPA permet de représenter un acte de mastication physiologique.

Les mesures de texture nous permettent de déterminer différents paramètres qui nous renseignent sur les propriétés mécaniques des gels. Ils sont calculés à partir de la courbe de suivi de la force appliquée pour déformer le gel en fonction du temps, qui a en général une allure similaire à la courbe présentée en Annexe 9. On s'intéresse en particulier à la fermeté, l'élasticité, l'adhérence, la cohésion et la masticabilité des gels étudiés.

Le tableau en Annexe 10 détaille les calculs réalisés pour obtenir ces paramètres, ainsi que leur définition au niveau physique et physiologique (d'après Civille et Szczesniak, 1973).

Le Tableau VI regroupe les moyennes de ces 5 paramètres lorsque l'on compare les conditions opératoires 2 à 2. Les valeurs en gras indiquent une différence significative entre les conditions opératoires comparées.

Tableau VI : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des mesures de TPA pour les différentes conditions étudiées

	Fermeté (N)	Adhérence (J)	Cohésion	Elasticité	Masticabilité (N)
B125	43,7^a	-0,16	0,89^d	0,98	38,4^g
B200	56,1^a	-0,16	0,91^d	0,98	49,7^g
S	62,2^b	-0,17	0,9^e	0,98	55^h
H	37,6^b	-0,15	0,89^e	0,98	33,1^h
G	45,8^c	-0,15	0,91^f	0,98	40,7ⁱ
NG	54,0^c	-0,17	0,89^f	0,98	47,4ⁱ

Les valeurs mesurées sont très faibles et n'évoluent pas en fonction des modalités testées. L'interprétation qui peut en être faite est que les échantillons sont déstructurés après

l'application d'une contrainte et incapables de reprendre leur forme d'origine. Cela est confirmé par les valeurs d'élasticité qui n'évoluent pas non plus en fonction des conditions testées.

Comparaison des gels 125 et 200-Bloom :

Les valeurs de fermeté des gels de 200-Bloom sont significativement plus importantes que celles des gels 125-Bloom, ce qui était prévisible dans la mesure où le Bloom renseigne sur la résistance mécanique des gels (Bigi *et al.*, 2004).

Les valeurs de cohésion et de masticabilité des gels sont significativement plus importantes pour les gels 200-Bloom que les gels 125-Bloom. La cohésion nous renseigne sur le fait que les gels 200-Bloom sont plus résistants à la déformation que les 125-Bloom, car il faut leur appliquer une plus grande déformation avant qu'ils ne se rompent (Civille et Szczesniak, 1973), et les valeurs plus importantes de masticabilité des gels de Bloom plus forts nous montrent qu'ils demandent plus d'énergie pour être mastiqués. Cela paraît logique et va dans le même sens que les observations de fermeté. Les gels 200-Bloom ont donc une plus grande résistance mécanique que les gels 125-Bloom.

Comparaison des gels en conditions sèche et humide :

Nous constatons que les gels obtenus à partir de gélatine placée en condition humide sont significativement moins fermes que ceux obtenus à partir de gélatine placée en condition sèche. Cela pourrait être dû à l'interaction de l'eau avec la structure de la gélatine. Dans ce cas, comme la résistance mécanique des gels est censée augmenter avec le nombre de triple-hélices de gélatine présentes (Bigi *et al.*, 2004), nous pouvons supposer que l'interaction de l'eau avec les hélices de gélatine à l'état de poudre entraîne un déroulement de celles-ci. Cela confirmerait l'hypothèse formulée dans la partie 3.1. Une autre option serait que cette différence de fermeté serait due à la différence de concentration entre les deux gels qui n'a pu être évitée au cours de l'expérimentation. Étant donné la faible différence de concentration entre ces gels (concentration de 20% pour les gels fabriqués à base de gélatine "humide" et 26% pour ceux à base de gélatine "sèche"), nous sommes partis du principe que les différences entre ces derniers étaient essentiellement dues à l'effet de l'humidité initiale de la gélatine.

Les valeurs de cohésion et de masticabilité significativement plus importantes des gels à base de gélatine issue d'une condition sèche par rapport à ceux fabriqués à partir d'une gélatine humide renforcent les observations précédentes et nous confirment la plus forte résistance

mécanique des gels fabriqués à partir de gélatine dite "sèche", sans pouvoir confirmer ou infirmer les deux hypothèses émises ci-dessus.

Comparaison des gels glyqués/non glyqués : Nous observons que la fermeté et la masticabilité des gels non glyqués sont significativement plus importantes que pour les gels glyqués, ce qui nous indique que la glycation aurait tendance à diminuer la résistance mécanique des gels. Ce même constat avait été fait par Yang *et al.* (2021) sur des gels de blanc d'œuf glyqués avec du ribose. L'équipe avait attribué cette diminution à l'action réductrice du ribose, qui réduirait les ponts disulfures au sein du gel. Nous ne pouvons pas nous appuyer sur cette même hypothèse car la gélatine ne contient pas d'acides aminés soufrés susceptibles de former ce genre de liaisons (*cf.* Tableau I).

Les valeurs de cohésion significativement plus importantes pour les gels glyqués que les gels non glyqués viennent néanmoins contredire notre précédente affirmation selon laquelle la gélatine glyquée est moins résistante que la gélatine non glyquée. Autant les valeurs de contraintes de cisaillement à la fin du domaine viscoélastique linéaire (τ -fin-LVR) obtenues par les mesures de rhéologie (*cf.* 3.3.2), qui traduisent la résistance du gel à la déstructuration lorsque l'on applique une contrainte sur celui-ci (Simões *et al.*, 2020), permettent de confirmer la plus grande résistance mécanique des gels 200-Bloom et de la gélatine "sèche", autant il n'est pas possible de s'appuyer sur ces valeurs pour s'assurer du caractère moins résistant de la gélatine glyquée qui est suggéré par les mesures de fermeté et de masticabilité, car elles ne sont pas significativement différentes.

Il paraît donc difficile d'interpréter le paramètre cohésion.

Tableau VII : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des mesures de texture lorsque l'on croise les variables "Bloom" et "Humidité" avec la variable "Glyqué/non glyqué"

		Fermeté (N)	Adhérence (J)	Cohésion	Elasticité	Masticabilité (N)
B125	G	39,1^a	-0,15	0,90^d	0,98	34,5^g
	NG	48,3^a	-0,17	0,88^d	0,98	42,2^g
B200	G	52,5	-0,15	0,91^e	0,98	46,9
	NG	59,7	-0,16	0,90^e	0,98	52,5
S	G	56,9^b	-0,16	0,91^f	0,98	50,7^h
	NG	67,5^b	-0,17	0,89^f	0,98	59,3^h
H	G	34,7^c	-0,14	0,90	0,98	30,7ⁱ
	NG	40,5^c	-0,16	0,89	0,98	35,4ⁱ

Le Tableau VII permet de mettre en évidence l'effet de la glycation en fonction du Bloom ou de l'humidité initiale des poudres de gélatine.

Le constat est le même que pour le Tableau VI: les gels glyqués sont significativement moins fermes que les gels non glyqués, ils ont aussi une valeur de masticabilité moins importante. Ils sont néanmoins plus cohésifs que les gels non glyqués. Les gels à base de gélatine sèche sont significativement plus fermes que ceux à base de gélatine humide. Ils sont également plus cohésifs et présentent des valeurs de masticabilité plus importantes.

Il est à noter qu'autant les gels 125-Bloom non glyqués sont significativement plus fermes que les gels glyqués, autant on n'observe pas de différences significatives entre la fermeté des gels 200-Bloom glyqués et non glyqués. Ceci pourrait confirmer que l'ultrastructure de la gélatine, notamment la longueur, la densité de ses chaînes protéiques et leur capacité à interagir avec l'eau ont bien une influence sur la capacité de fixation du ribose.

3.3.2. Rhéologie

Les mesures de rhéologie nous apportent des renseignements sur la structure des gels étudiés. On s'intéresse à la réponse de ces derniers aux perturbations mécaniques induites par le rhéomètre au cours de la mesure, dans notre cas un balayage en déformation. On trace les modules G' et G'' , qui correspondent respectivement aux modules élastique et visqueux des gels en fonction de la contrainte appliquée. Ces deux modules traduisent le comportement de solides viscoélastiques des gels de gélatine lorsqu'ils sont pris en masse (Reeve, 2008). Le domaine de viscoélasticité linéaire ou LVR (Linear Viscoelastic Region) correspond à la plage de déformations ou de contraintes que l'on peut appliquer sans que cela engendre de changements au niveau de la structure du gel. Au-delà d'une certaine contrainte seuil, que nous avons ici nommée τ -fin-LVR, le gel est déstructuré par le traitement appliqué et nous observons une diminution des valeurs de G' qui témoigne d'une perte de ses propriétés élastiques. Lorsque $G'=G''$ on considère que le matériau est complètement déstructuré, et lorsque l'on applique une contrainte supérieure à la contrainte τ -croisement correspondant à cette déstructuration, cela entraîne l'écoulement du matériau étudié (Simões *et al.*, 2020).

Les valeurs de module élastique (G') obtenues en rhéologie sont systématiquement plus importantes que les valeurs de module visqueux (G''), à l'image de l'Annexe 11, ce qui confirme que les gels étudiés se comportent comme des solides viscoélastiques, ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où les mesures sont effectuées sur des gels pris en masse.

Le Tableau VIII regroupe les moyennes des différentes données recueillies dans le cadre des mesures de rhéologie.

Tableau VIII : Données issues des mesures rhéologiques

	τ - croisement (Pa)	G'max (Pa)	τ -fin-LVR (Pa)
B125	7171^a	14073^b	3627^e
B200	8781^a	17532^b	4635^e
S	10377	20013^c	5484^f
H	5576	11593^c	2777^f
G	7915	14097^d	4159
NG	8037	17509^d	4103

Comparaison des gels 125 et 200-Bloom :

Le seul paramètre pour lequel nous observons une différence significative entre les valeurs de contrainte de cisaillement au croisement des modules élastique et visqueux (τ -croisement) est le Bloom. Ce dernier renseignant sur la résistance mécanique des gels, il est logique que les gels 200-Bloom aient une valeur de τ -croisement supérieure, ce qui signifie qu'il faut leur appliquer une contrainte plus forte que pour les gels 125-Bloom pour qu'ils soient complètement destructurés. De plus, τ -croisement renseigne sur le degré de réticulation de la matrice. Cela indiquerait donc que les gels 200-Bloom forment un réseau plus dense que les gels 125-Bloom. Les valeurs significativement plus importantes de τ -fin-LVR indiquent une plus forte résistance de la structure des gels glyqués à la contrainte de cisaillement avant que sa structure ne commence à être perturbée, ce qui confirme nos observations précédentes. Nous constatons également que les gels 200-Bloom présentent une valeur moyenne de G'max plus importante que celle des gels 125-Bloom. Or, les valeurs de G' sont représentatives du caractère élastique des échantillons ainsi que de la conservation de l'énergie en fin de contrainte (Castellani, 2013). De plus, selon Rather *et al.* (2022), il existe un lien étroit entre le module élastique et le nombre de triple-hélices. Plus les valeurs de G' sont élevées et plus le nombre de structures en triple-hélices est important. Le nombre de triple-hélices étant directement corrélé au Bloom d'après la littérature (Bigi *et al.*, 2004), les valeurs de G'max que nous obtenons sont tout à fait logiques. Ainsi, les mesures rhéologiques menées sur les gels 125 et 200-Bloom sont en accord avec la littérature et nous permettent également de confirmer nos observations en TPA.

Comparaison des gels glyqués/non glyqués :

La seule différence significative dans les paramètres rhéologiques étudiés pour les gels glyqués et non glyqués est la valeur de G'max, qui indique la présence d'un nombre plus important de triple-hélices dans la gélatine non glyquée que dans la gélatine glyquée. Cela irait dans le sens

de notre hypothèse selon laquelle la fixation du ribose sur les triple-hélices de la gélatine empêcherait le ré-enroulement de ces structures. Comme G'_{max} est également lié au caractère élastique des gels, cela semble indiquer une plus forte élasticité des gels non glyqués. Néanmoins, on ne retrouve pas cette différence au niveau des mesures de TPA, où l'élasticité correspond à la vitesse à laquelle un produit déformé retrouve sa forme initiale après la disparition de la force de déformation qui lui était appliquée.

Comme aucune différence significative n'est observée entre les valeurs de τ -croisement, cela signifie que les résistances des gels au cisaillement sont équivalentes. Nous pouvons donc en déduire que le nombre de triple-hélices ne suffit pas à expliquer la résistance des gels, et que cette résistance serait plutôt due à des liaisons inter-hélices.

Comparaison des gels de gélatine en conditions humide et sèche :

Les valeurs de τ -fin-LVR obtenues pour les conditions d'humidités initiales nous renseignent sur une différence notable de structure des gels. En effet, ils restent structurés plus longtemps, sous contrainte plus élevée, en condition sèche, révélant ainsi la présence d'un réseau de polymères plus rigide. Cela rejoint nos observations en TPA qui montraient qu'en condition sèche, les gels présentent des propriétés de résistance mécanique plus importantes. Néanmoins, ceci est contradictoire avec les observations réalisées en MET où des agrégats sont majoritairement visibles en conditions humides. Ces observations peuvent s'expliquer par une sensibilité insuffisante des méthodes de TPA et de rhéologie pour mettre en évidence des changements ultra-structuraux, potentiellement très localisés, des matrices.

Comparaison des gels en croisant différents paramètres de réaction :

Nous constatons que les valeurs de G'_{max} les plus élevées sont celles obtenues pour les gels préparés avec de la gélatine sèche, non-glyquée et à Bloom élevé (cf. Tableau VIII et Tableau IX). Cela est cohérent avec les travaux de Bigi *et al.* (2004) concernant le Bloom. Néanmoins, les résultats concernant la condition sèche ne sont pas en accord avec nos observations en MET. En effet, ces dernières nous révèlent la présence d'agrégats en condition humide uniquement. Les résultats de Portier (2016), qui affirment qu'une humidité élevée favorise la formation de triple-hélices nous incitent à prendre avec réserve les mesures de rhéologie.

Le Tableau IX permet de comparer l'effet de la glycation sur les paramètres rhéologiques étudiés en fonction du Bloom ou de l'humidité initiale des poudres de gélatine.

Tableau IX : Moyennes des valeurs obtenues à l'issue des traitements de TPA et de rhéologie lorsque l'on croise les variables "Bloom" et "Humidité" avec la variable "glyqué/non glyqué"

		Croisement (Pa)	τ -croisement (Pa)	G'max (Pa)	τ -fin-LVR (Pa)
B125	G	3977	6981	12131^a	3741
	NG	5003	7361	16015^a	3513
B200	G	5906	8849	16062	4577
	NG	6856	8713	19002	4693
S	G	6148	10093	17796^b	5363
	NG	7334	10661	22229^b	5605
H	G	3735	5738	10397^c	2954^d
	NG	4526	5413	12788^c	2600^d

Nous n'observons pas de différences entre les conditions glyquées et non glyquées pour les gélatines 200-Bloom, ce qui signifie que la structure des gels glyqués et non glyqués de 200-Bloom sont similaires. Cela est à relier aux observations de TPA qui indiquaient que les propriétés mécaniques de ces gels étaient similaires. Néanmoins, cela contredit nos observations au MET qui semblaient indiquer des différences au niveau des gels 200-Bloom glyqués et non glyqués. Il apparaît de nouveau difficile de mettre en relation les résultats obtenus en TPA et rhéologie avec les observations réalisées au MET.

En ce qui concerne la stabilité de la structure des gels (τ -fin-LVR), si l'on s'en réfère au Tableau IX, elle est équivalente entre les gels fabriqués avec de la gélatine sèche, qu'ils soient glyqués ou non. Néanmoins, dans le cas des gélatines humides, une différence significative est observée entre les conditions glyquée et non glyquée. Cette fois, le gel glyqué semble conserver sa structure à plus forte contrainte que le gel non glyqué. L'effet de l'humidité initiale sur la structure du gel semble donc, au vu des résultats, bien présente. Néanmoins, cela contredit les résultats de TPA qui indiquaient une plus forte résistance mécanique des gels humides non glyqués. Cette fois, on constate que les résultats de rhéologie et de TPA ne sont pas toujours concordants.

Ces informations contradictoires nous amènent à dire qu'il est difficile de concilier les interprétations issues des résultats des différentes méthodes analytiques. Ceci pourrait s'expliquer un manque de sensibilité des méthodes de mesure des propriétés mécaniques des gels pour détecter des changements ultra-structuraux, ou par des hétérogénéités au sein des matrices. En effet, Duconseille *et al.* (2017a, b) ont montré que le taux de dissolution de la gélatine, étroitement lié à sa structure, est très dépendant de la composition et des conditions environnementales.

3.4.Synthèse des résultats obtenus

La microscopie électronique en transmission nous a permis de mettre en évidence un fort effet du degré Bloom. Par exemple, des structures nanométriques de type agrégats ont pu être clairement identifiées dans la condition humide glyquée 125-Bloom alors qu'elles étaient absentes dans les mêmes conditions pour une gélatine 200-Bloom. Ceci est également vrai au niveau de l'humidité. En effet, à Bloom identique (125), en condition glyquée, des structures en agrégats très nettes sont visibles à humidité élevée et non visibles en conditions sèches. Pour les gélatines 200-Bloom, nous observons moins d'agrégats une fois les gels glyqués, ce qui signifierait que le ribose entre en compétition avec d'autres types de liaisons, sans pour autant établir de liaisons covalentes.

Les mesures en FT-IR, entre les échantillons glyqués et non glyqués, indiquent que l'ajout de ribose induit des modifications au niveau de la bande des sucres, notamment à 1039 et 1081 cm^{-1} . Ces nombres d'ondes correspondent respectivement à la formation de liaisons covalentes entre le ribose et les acides aminés et à l'accumulation de produits de glycation. En comparant les conditions d'humidité, il apparaît que des modifications ont lieu au niveau des bandes amides propres aux protéines. Il semble que l'humidité initiale ait un effet sur la structure des protéines notamment au niveau des triple-hélices. Lorsque l'on compare les humidités en condition glyquée, un seul nombre d'onde caractéristique varie significativement (1623 cm^{-1}). Ce pic pourrait être attribué à une modification des liaisons hydrogène au niveau de la structure intermoléculaire des gels.

Les mesures des propriétés mécaniques des gels ont permis de valider le protocole expérimental en fonction des paramètres expérimentaux en mettant en évidence une bonne séparation des groupes d'échantillons. Les mesures de texture montrent que la glycation, pourtant effective au sein des matrices comme le montrent les résultats des autres méthodes, ne permet pas de renforcer la fermeté des gels selon les conditions opératoires. Il apparaît également que le degré Bloom aurait un effet sur la capacité de la gélatine à former des liaisons avec le ribose, du fait de la relation entre ce paramètre et la quantité de triple-hélices présentes dans le gel, et la capacité de ces triple-hélices à interagir avec l'eau. Les valeurs de G'_{max} obtenues en rhéologie, représentatives de la quantité de triple-hélices au sein du gel, ne sont pas toujours cohérentes avec la littérature en fonction des paramètres étudiés, et peuvent parfois également être en contradiction avec nos observations en MET. Il semble néanmoins envisageable de dire

que l'humidité initiale, associée à un ajout de ribose, a un effet sur la structure des gels qui peut être mis en évidence par la valeur correspondant à la fin du domaine viscoélastique linéaire.

Ces observations nous amènent à établir des pistes de mécanismes permettant d'expliquer les effets du degré Bloom de la gélatine et de son humidité initiale sur la réaction de glycation.

Nous pensons tout d'abord que la "densité" des gels, c'est-à-dire le fait qu'ils contiennent une quantité plus ou moins importante de structures en triple-hélices et de chaînes protéiques de haut poids moléculaire enchevêtrées entre elles, aurait une influence sur la réaction de glycation. Il est possible qu'une densité importante du réseau protéique à l'intérieur des gels empêche la fixation des sucres sur les sites réactifs des protéines du fait de l'encombrement stérique important des chaînes protéiques contenues dans la matrice. Il se pourrait alors que le ribose entre en compétition avec les liaisons hydrogène inter et intra-chaînes protéiques présentes au sein des gels, et formées entre les acides aminés polaires de la gélatine tels que la lysine, l'arginine, la sérine et la thréonine, qui sont impliqués dans la réaction de glycation. Cela conduirait à un déroulement des triple-hélices et à une disparition des agrégats visibles en MET. Cette densité dépend du Bloom de la gélatine, car plus il est élevé, plus les chaînes protéiques sont longues et forment des triple-hélices, mais elle peut également dépendre de l'humidité de celle-ci (au cours de sa conservation et également lors de la manipulation), puisque l'eau est impliquée dans la formation de liaisons hydrogène inter et intra-chaînes au niveau des chaînes de gélatine.

L'humidité de la gélatine seule, pourrait également avoir un effet sur la réaction de glycation. Nous pensons que des conditions d'humidité élevée permettraient un déroulement des triple-hélices de gélatine, ce qui mettrait à découvert les sites de fixation du ribose, conduisant à la formation de liaisons covalentes entre le ribose et les acides aminés réactifs de la gélatine. Cela engendrerait la formation d'agrégats à l'échelle microscopique. Cela laisse supposer qu'il faudrait se placer dans des conditions où le réseau protéique est peu dense, sous peine de rencontrer des problèmes de gêne stérique et de compétition du ribose avec les liaisons hydrogène intra et inter-chaînes protéiques, comme mentionné précédemment.

Conclusion

Pour rappel, notre problématique est : **L'humidité initiale et le degré Bloom de la gélatine ont-ils un effet sur les propriétés de texturation de la réaction de glycation ?**

À l'issue de nos travaux, nous pensons que degré Bloom et l'humidité de la gélatine ont bien un effet sur les propriétés de texturation de la glycation. Une approche multi-échelle nous a permis de mettre en évidence un certain nombre d'interactions entre ces paramètres, et leur rôle dans la structuration des gels, notamment au niveau de la "densité" de ces derniers qui peut conduire à gêner la glycation en limitant la mise en relation du ribose avec les résidus réactifs d'acides aminés. La quantité de liaisons hydrogène présentes dans les gels, liée à l'humidité de la gélatine et donc à ses conditions de stockage, jouerait également un rôle lors de la fixation du ribose aux sites réactifs.

Les différentes méthodes que nous avons utilisées nous apportent des informations complémentaires sur les effets de l'humidité initiale et du degré Bloom de la gélatine sur la glycation. Elles nous permettent de constater que les mécanismes de la glycation (liaisons covalentes) ont bien lieu au niveau chimique (FT-IR) et qu'ils ont des conséquences au niveau ultra-structural (MET), mais sans qu'il soit possible de les détecter par des mesures rhéologiques ou de texturales. Les résultats obtenus sont à prendre avec précaution car l'échelle à laquelle sont effectuées les mesures peut induire des erreurs dans l'interprétation des résultats.

Cette étude nous fournit des pistes d'explications des mécanismes impliqués, et il sera nécessaire d'utiliser d'autres méthodes telles que la microspectroscopie Raman ou le dichroïsme circulaire pour comprendre les phénomènes impliqués.

Cela nous amène à dire que la variabilité des gélatines, qui dépend de leurs conditions de stockage et de préparation, ne permet pas d'appliquer de manière généralisée la glycation à des fins de texturation sur de telles matrices.

La gélatine est parfois considérée comme un milieu modèle car elle est simple à mettre en œuvre et peu coûteuse mais, sa complexité structurale ainsi que son instabilité envers les conditions environnementales en font une matrice très complexe à étudier. Il est cependant envisageable d'étudier la réaction de glycation pour texturer d'autres matrices alimentaires, moins sujettes aux variations des conditions environnementales, comme la viande fraîche ou des milieux hybrides à base de protéines animales et végétales. La glycation reste donc une alternative intéressante à exploiter en tant que substitut à l'emploi d'additifs texturants.

Références bibliographiques

- Achouri A., Boye J. I., Yaylayan V. A., Yeboah F. K., 2005. Functional Properties of Glycated Soy 11S Glycinin. *Food Chemistry and Toxicology*, 70(4), C269-C274.
- Alee M., Duan Q., Chen Y., Liu H., Ali A., Zhu J., Jiang T., Rahaman A., Chen L., Yu L., 2021. Plasticization Efficiency and Characteristics of Monosaccharides, Disaccharides, and Low-Molecular-Weight Polysaccharides for Starch-Based Materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(35), 11960-11969. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04374>
- Bhat R., Karim A. A., 2014. Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. *J Food Sci Technol*, 51(7), 1326-1333. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0652-9>
- Bigi A., Panzavolta S., Rubini K., 2004. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25(25), 5675-5680. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033>
- Bridelli, M. G., Stani, C., Bedotti, R., 2017. Fourier transform infrared conformational investigation of type I collagen aged by in vitro induced dehydration and non-enzymatic glycation treatments. *Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 90(1). <https://doi.org/10.4081/jbr.2017.6254>
- Bruker, 2022. Guide de la spectroscopie IRTF. <https://www.bruker.com/fr/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> (consulté le 29.05.22)
- Busnel J. P., Morris E. R., Ross-Murphy S. B., 1989. Interpretation of the renaturation kinetics of gelatin solution. *Int J Biol Macromol*, 11, 119-125. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(89\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(89)90053-6)
- Campos Vidal B., Mello M. L. S., 2019. Variable collagen-DNA complex formation in vitro as assessed by optical anisotropy and infrared microspectroscopy. *Int J Biol Macromol*, 131, 510-519. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.092>
- Castellani R., 2013. Caractérisation rhéologique et structurale de gels colloïdaux utilisés pour la décontamination nucléaire. Nancy : Université de Lorraine, 132 p. (Thèse de doctorat)
- Chobert J.-M., Gaudin J.-C., Dalgalarondo M., Haertlé T., 2006. Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin. *Biotechnol Adv*, 24(6), 629-632. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.004>
- Civille G., Szczesniak A., 1973. Guidelines to training a texture profile panel. *J Texture Stud*, 4, 204-223. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1973.tb00665.x>
- Commission Européenne, 2015. Periodic Report Summary 1 - PERFORMANCE (Development of Personalised Food using Rapid Manufacturing for the Nutrition of elderly Consumers). <https://cordis.europa.eu/project/id/312092/reporting/fr> (consulté le 16/11/21)

- Dalibart M., Servant L., 2000. Spectroscopie dans l'infrarouge. *Techniques de l'ingénieur*. Réf P2845 V3. 26 p.
- Djabourov M., Leblond J., Papon P., 1988. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *49*, 319-332. <https://doi.org/10.1051/jphys:01988004902031900>
- Duconseille A., Astruc T., Quintana N., Meersman F., Sante-Lhoutellier V., 2015. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, *43*, 360-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.006>
- Duconseille A., Traikia M., Lagrée M., Jousse C., Pagès G., Gatellier P., Astruc T., Santé-Lhoutellier V., 2017a. The impact of processing and aging on the oxidative potential, molecular structure and dissolution of gelatin. *Food Hydrocolloids*, *66*, 246-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.034>
- Duconseille A., Wien F., Audonnet F., Traore A., Refregiers M., Astruc T., Santé-Lhoutellier V., 2017b. The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. *Food Hydrocolloids*, *66*, 378-388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.005>
- Etxabide A., Urdanpilleta M., Guerrero P., de la Caba K., 2015. Effects of cross-linking in nanostructure and physicochemical properties of fish gelatins for bio-applications. *Reactive and Functional Polymers*, *94*, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.006>
- Fortune M., 2021. Mise en place d'une méthode d'hydrolyse enzymatique pour l'étude de la réaction de glycation dans des gels protéiques. Clermont-Ferrand : Université Clermont Auvergne, 22 p. (Rapport de stage Master 1)
- Gonzalez L. G., Wess T. J., 2013. The effects of hydration on the collagen and gelatine phases within parchment artefacts. *Heritage Science*, *1*(14), 1-8. <https://doi.org/10.1186/2050-7445-1-14>
- Guo L., Colby R. H., Lusignan C. P., Whitesides T. H., 2003. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, *36*, 9999-10008. <https://doi.org/10.1021/ma034264s>
- Huc A., Sanejouand J., 1968. Etude du spectre infra-rouge du collagène acido-soluble. *Biochim. Biophys. Acta*, *154*, 408-401.
- INRAE, Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, 2019. Le projet scientifique de l'équipe Imagerie et Transferts. <https://www6.clermont.inrae.fr/quapa/Les-equipes/Imagerie-et-Transferts/Le-projet-scientifique-de-l-equipe-Imagerie-et-Transferts> (consulté le 05.05.22)
- INRAE, Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, 2021a. Histoire de l'INRA. <https://www6.inrae.fr/comitedhistoire/Organisations-amies/Histoire-des-Instituts/INRA>
- INRAE, Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, 2021b. Missions, organisation et chiffres-clés - 2021. Paris : INRAE. 25 p.

- INRAE, Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, 2022. QuaPA en quelques mots. <https://www6.clermont.inrae.fr/quapa> (consulté le 05.05.22)
- Kaminska A., Sionkowska A., 1996. Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen. *Polymer Degradation and Stability*, 51, 19-26. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(95\)00159-X](https://doi.org/10.1016/0141-3910(95)00159-X)
- Kazanci M., Haciosmanoglu S. K., Kamel G., 2021. Synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy (sFTIRM) analysis of unfolding behavior of electrospun collagen nanofibers. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 251, 119420. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119420>
- Kozlov P. V., Burdygina G. I., 1983. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification *Polymer reviews*, 24, 651-666. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(83\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(83)90001-0)
- Krishnakumar G. S., Gostynska N., Campodoni E., Dapporto M., Montesi M., Panseri S., Tampieri A., Kon E., Marcacci M., Sprio S., Sandri M., 2017. Ribose mediated crosslinking of collagen-hydroxyapatite hybrid scaffolds for bone tissue regeneration using biomimetic strategies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 77, 594-605. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.255>
- Kuai L., Liu F., Ma Y., Goff H. D., Zhong F., 2020. Regulation of nano-encapsulated tea polyphenol release from gelatin films with different Bloom values. *Food Hydrocolloids*, 108, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106045>
- Lefèvre T., Subirade M., 2000. Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate b-lactoglobulin gels. *Biolpolymers*, 54, 578-586. <https://doi.org/10.1002/1097-0282>
- Levine H., Slade L., 1988. Water as a plasticizer: physico-chemical aspects of low-moisture polymeric systems. In : Water Science Reviews 3. Water dynamics. Cambridge: Cambridge University Press. 79-185. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511552083.002>
- Li C., Zhu W., Xue H., Chen Z., Chen Y., Wang X., 2015. Physical and structural properties of peanut protein isolate-gum Arabic films prepared by various glycation time. *Food Hydrocolloids*, 43, 322-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.003>
- Liu J., Ru Q., Ding Y., 2012. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International*, 49(1), 170-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.034>
- Liu D., Nikoo M., Boran G., Zhou P., Regenstein J. M., 2015. Collagen and gelatin. *Annu Rev Food Sci Technol*, 6, 527-557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Liu L., Lin W.-J., Liu H.-Z., Shi A.-M., Hu H., Nasir M. N., Deleu M., Wang Q., 2017. Effect of xylose on the structural and physicochemical properties of peanut isolated protein based films. *RSC Advances*, 7(83), 52357-52365. <https://doi.org/10.1039/c7ra07381j>

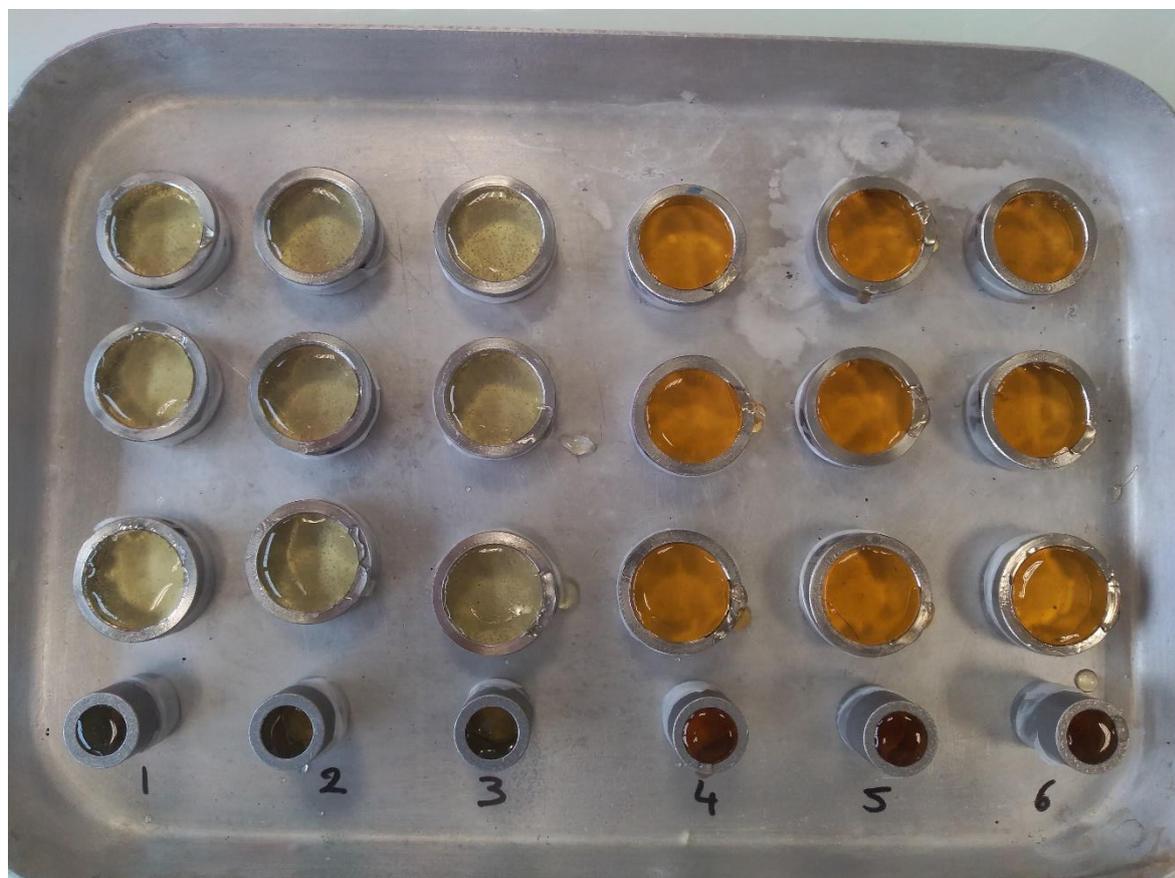
- Loisel C., 2021. Organisation des systèmes alimentaires. Polycopié d'enseignement, UE 2.3., Module « Structure, microstructure et texture des aliments, Aspects généraux : les principales structures des aliments ». Nantes : Oniris, 68 p.
- Matsudomi N., Nakano K., Soma A., Ochi A., 2002. Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the Maillard reaction. *J Agric Food Chem*, 50, 41134-118. <https://doi.org/10.1021/jf0114334>
- Pokora M., Eckert E., Zambrowicz A., Bobak L., Szoltysik M., Dabrowska A., Chrzanowska J., Polanowski A., Trziszka T., 2013. Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Sci Nutr*, 1(2), 184-195. <https://doi.org/10.1002/fsn3.27>
- Portier F., 2016. *Biomatériaux collagène/gélatine - Des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides*. Paris : Université Pierre et Marie Curie, 269 p. (Thèse de doctorat)
- Rather J. A., Majid S. D., Dar A. H., Amin T., Makroo H. A., Mir S. A., Barba F. J., Dar B. N., 2022. Extraction of Gelatin From Poultry Byproduct: Influence of Drying Method on Structural, Thermal, Functional, and Rheological Characteristics of the Dried Gelatin Powder. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.895197>
- Reeve P. et Amigoni S., 2008. La rhéologie - Un outil précieux pour la formulation cosmétique. *L'Actualité Chimique*, (323-324), 89-98.
- Saeki H., Inoue K., 1997. Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation. *J. Agric. Food Chem*, 45, 3419-3422.
- Simões A., Miranda M., Cardoso C., Veiga F., Vitorino C., 2020. Rheology by Design: A Regulatory Tutorial for Analytical Method Validation. *Pharmaceutics*, 12(9), 820. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090820>
- Stevenson M., Long J., Guerrero P., de la Caba K., Seyfoddin A., Etxabide A., 2019. Development and characterization of ribose-crosslinked gelatin products prepared by indirect 3D printing. *Food Hydrocolloids*, 96, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.018>
- Sun Y., Hayakawa S., Izumori K., 2004. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: Effect on protein structure and gel properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1293-1299. <https://doi.org/10.1021/jf030428s>
- Tessier F. J., 2019. Les AGE exogènes et autres produits de Maillard. *Médecine des maladies Métaboliques*, 13(7), 582-587. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(19\)30180-4](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(19)30180-4)
- Twarog C., 2017. Particules Janus pour des applications industrielles : stabilités et incorporation de principes actifs. Nancy : Université de Lorraine, 82 p. (Thèse de Pharmacie)
- Wang L., Zhang M., Bhandari B., Yang C., 2018. Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *Journal of Food Engineering*, 220, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.029>

- Wang C., Li J., Li X., Zhang M., Gu L., Chang C., Su Y., Yang Y., 2020. Molecular forces and gelling properties of heat-induced gel from egg white protein glycated with isomaltoligosaccharide. *Food Hydrocolloids*, 99, 105356. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105356>
- Wang K., Li Y., Zhang Y., Huang M., Xu X., Ho H., Huang H., Sun J., 2022. Improving physicochemical properties of myofibrillar proteins from wooden breast of broiler by diverse glycation strategies. *Food Chemistry*, 382, 132328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132328>
- Xu Y., Zhao Y., Wei Z., Zhang H., Dong M., Huang M., Han M., Xu X., Zhou G., 2020. Modification of myofibrillar protein via glycation: Physicochemical characterization, rheological behavior and solubility property. *Food Hydrocolloids*, 105, 105852. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105852>
- Yan M., Guevara-Oquendo V. H., Yu P., 2022. Using Mid-IR spectroscopy (ATR-FTIR) as a fast analytical tool to reveal association between protein spectral profiles and metabolizable protein supply, protein rumen degradation characteristics and estimated intestinal protein digestion before and after rumen incubation of faba bean partitions and faba bean silage. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 273, 121022. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121022>
- Yang M., Liu J., Yang X., Li S., Li C., Liu B., Ma S., Liu X., Du Z., Zhang T., Yu Y., 2021. Effect of glycation degree on the in vitro simulated gastrointestinal digestion: A promising formulation for egg white gel with controlled digestibility. *Food Chem*, 349, 129096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129096>
- Zhao C.-B., Zhou L.-Y., Liu J.-Y., Zhang Y., Chen Y., Wu F., 2016. Effect of ultrasonic pretreatment on physicochemical characteristics and rheological properties of soy protein/sugar Maillard reaction products. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2342-2351. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2206-z>

Annexes

Annexe 1 : Exemples de gels glyqués et non glyqués obtenus

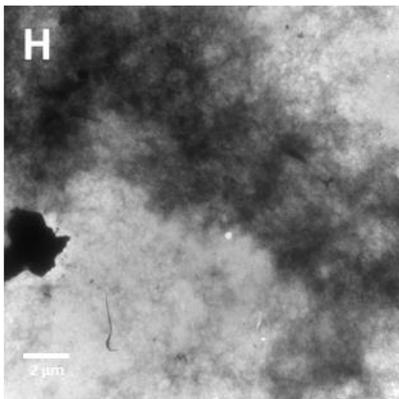
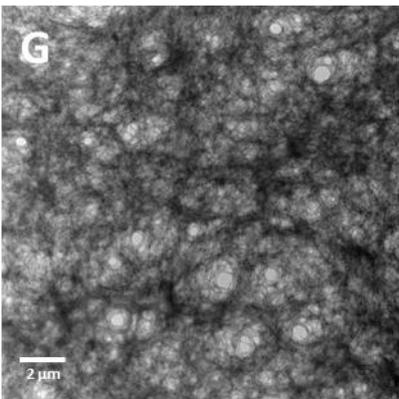
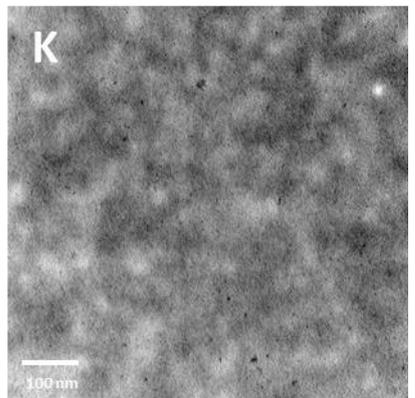
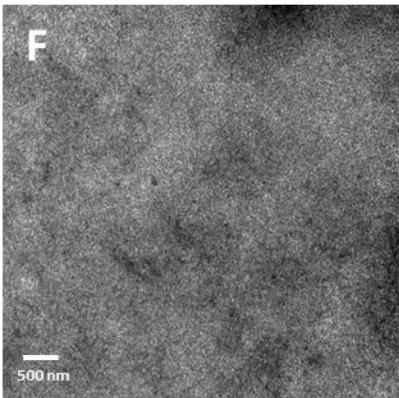
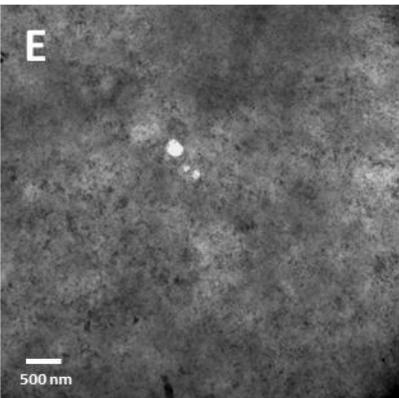
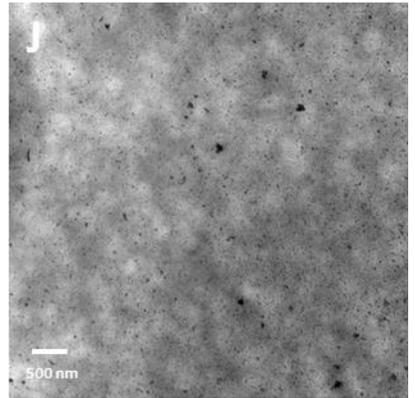
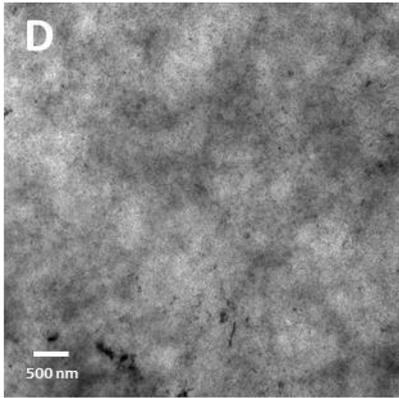
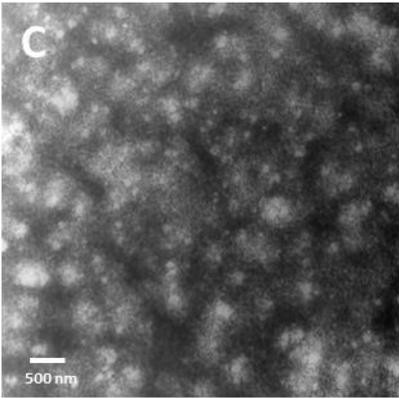
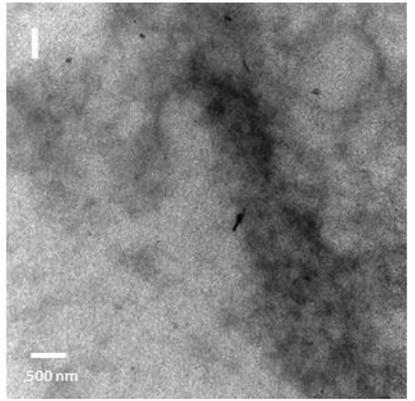
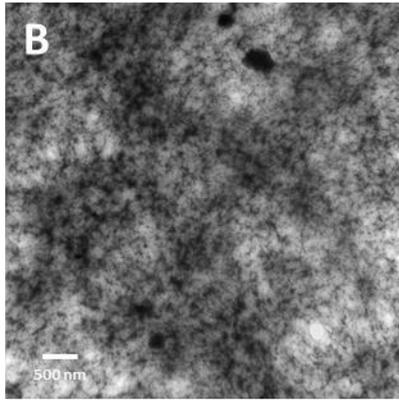
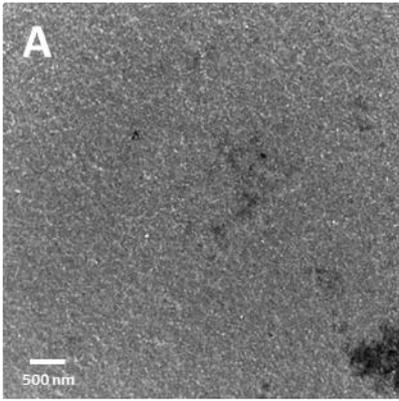
Les gels non glyqués correspondent aux trois premières colonnes à gauche de l'image, et les gels glyqués aux colonnes restantes.



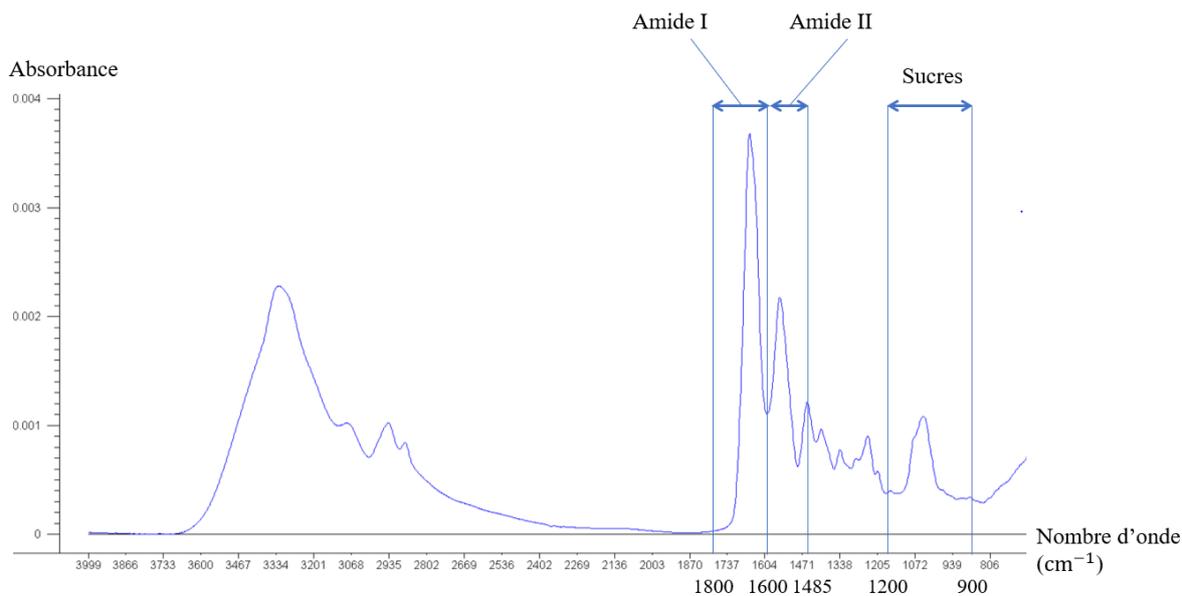
Annexe 2 : Observation de gels de gélatine en microscopie électronique en transmission

A : B125, humidité 25%, sans ribose ; B : B200, humidité 25%, sans ribose ; C : B125, humidité 25%, avec ribose ; D : B125, humidité 5%, avec ribose ; E : B125, humidité 5%, sans ribose ; F : B200, humidité 5%, sans ribose ; G : B200, humidité 25%, sans ribose ; H : B200, humidité 5%, sans ribose ; I : B200, humidité 25%, avec ribose ; J : B200, humidité 5%, avec ribose ; K : B125, humidité 25%, sans ribose.

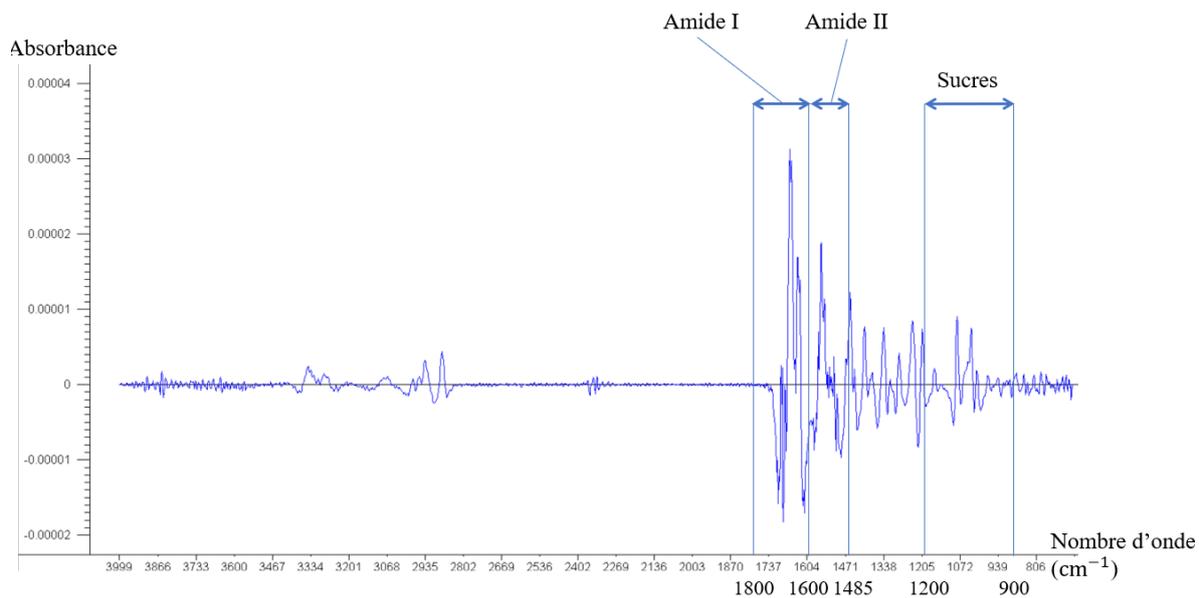
Grossissements : G, H : x8000 ; A, B, C, D, E, F, I, J : x70000 ; K : x200000



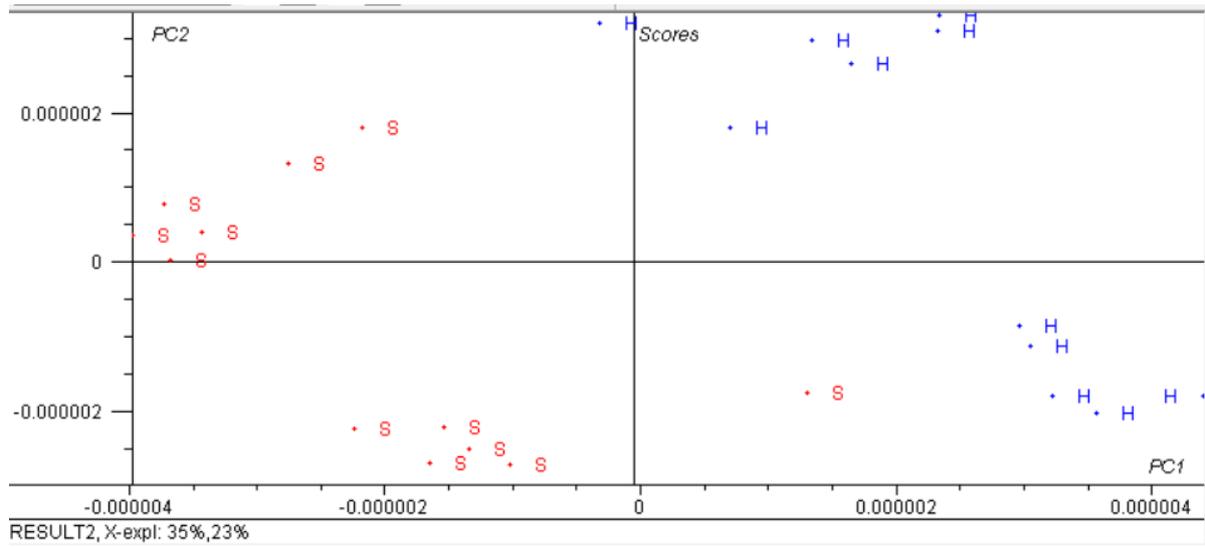
Annexe 3 : Exemple de spectre entier obtenu après correction de ligne de base et normalisation (gélatine 125-bloom glyquée en condition sèche)



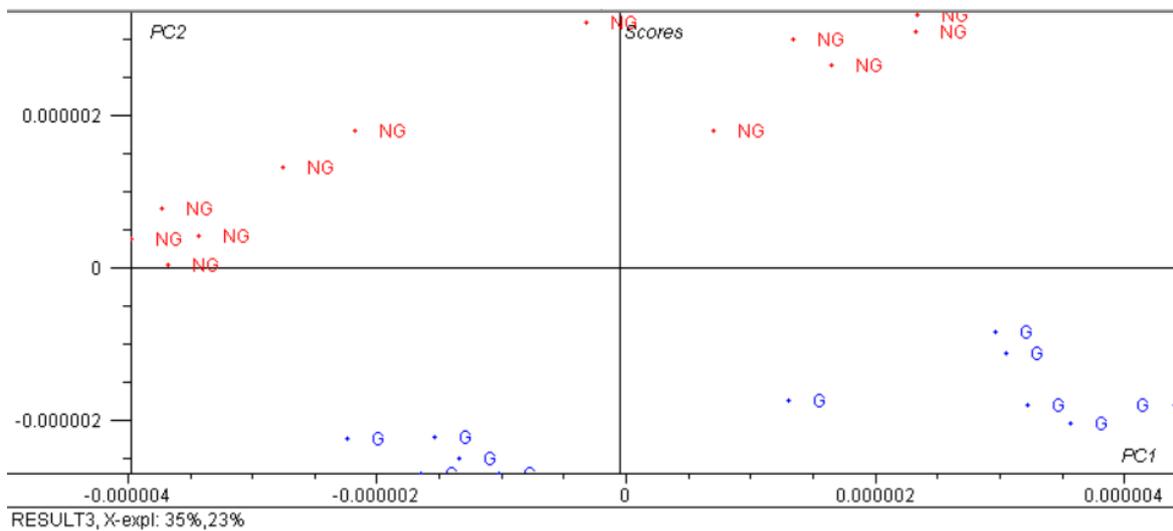
Annexe 4 : Exemple de spectre obtenu après correction de ligne de base, normalisation et dérivation (gélatine 125-bloom glyquée en condition sèche)



Annexe 5 : ACP réalisée sur les dérivées secondes des bandes amides I et II et des sucres –
 Comparaison de l'effet de l'humidité initiale de la gélatine



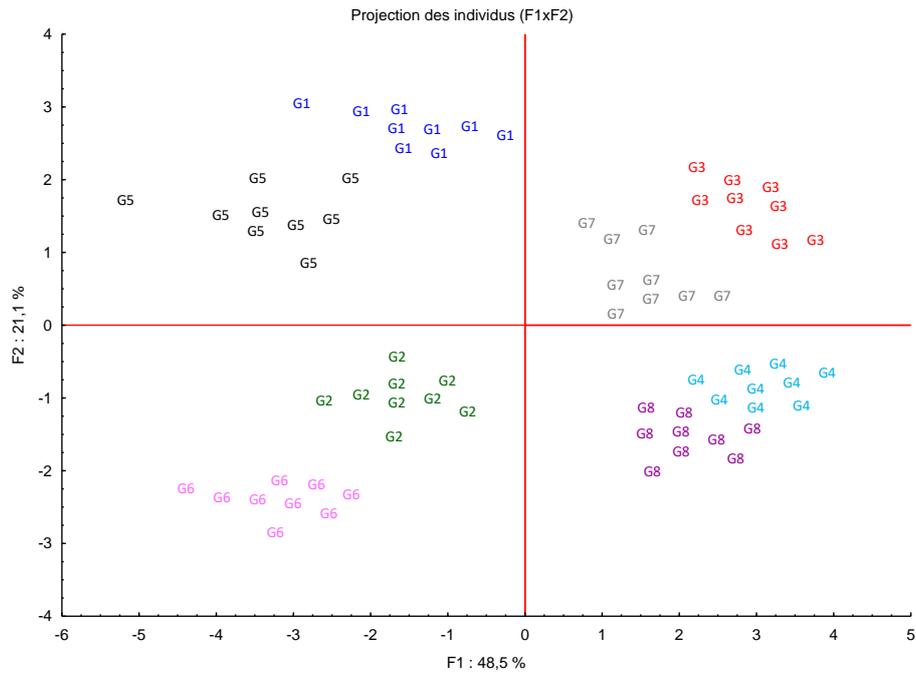
Annexe 6 : ACP réalisée sur les dérivées secondes des bandes amides I et II et des sucres –
 Comparaison de l'effet de la glycation



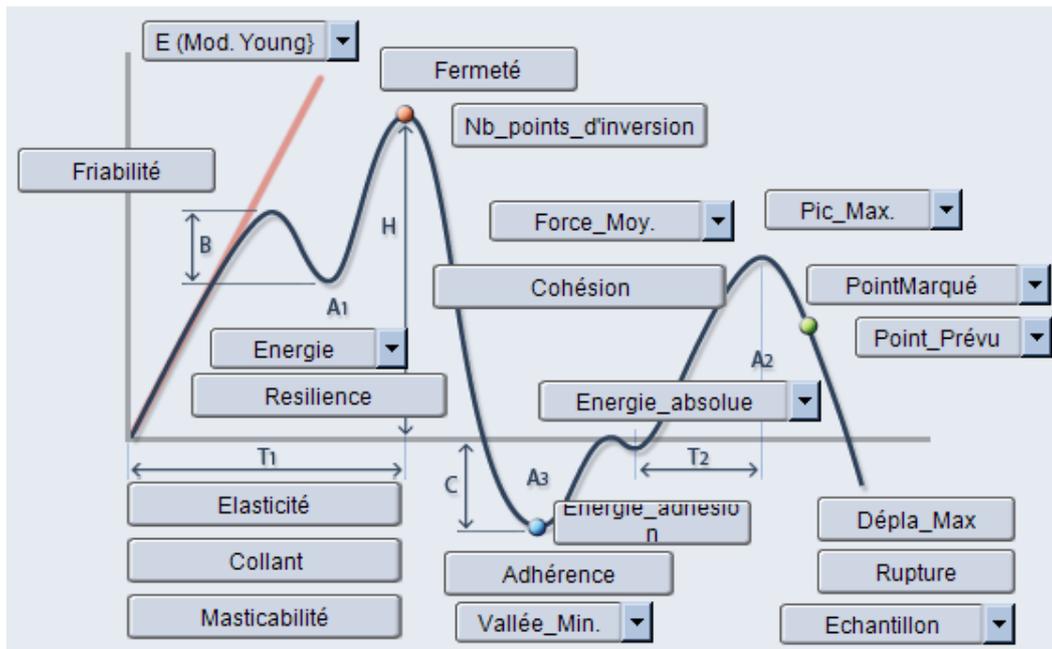
Annexe 7 : Structures chimiques attribuées aux longueurs d'ondes caractéristiques issues de la littérature.

Nombre d'onde (cm⁻¹)	Correspondances dans la littérature	Source
Sucres		
1081	- 1080 cm ⁻¹ et 1032 cm ⁻¹ : accumulation des produits de glycation dans la matrice - 1081-1035 cm ⁻¹ : formation d'une liaison covalente entre le ribose et les groupements amine du collagène	Bridelli <i>et al.</i> , 2017
1064		Krishnakumar <i>et al.</i> , 2017
1039		
Amide I		
1687	1690-1630 : feuillets-β	Kazanci <i>et al.</i> , 2021
1681		
1662	Structure en triple hélice du collagène I	Kazanci <i>et al.</i> , 2021
1660		
1658	1650 : liaison C=O de la structure en hélice du collagène	Huc <i>et al.</i> , 1968
1639	1630 cm ⁻¹ : structure déroulée du collagène 1630 cm ⁻¹ : feuillets-β 1642-1630 cm ⁻¹ : liaison C=O de l'amide I du collagène (de type I)	Kaminska <i>et al.</i> , 1996 Yan <i>et al.</i> , 2022 Campos Vidal <i>et al.</i> , 2019
1623	1623 cm ⁻¹ : chaînes β des feuillets-β 1641-1623 cm ⁻¹ : feuillets-β parallèles 1630 cm ⁻¹ : structure déroulée du collagène	Lefèvre et Subirade, 2000 Kaminska <i>et al.</i> , 1996 Kaminska <i>et al.</i> , 1996
Amide II		
1556	1555 cm ⁻¹ : forme hélicoïdale du collagène	Kaminska <i>et al.</i> , 1996
1532	1530 cm ⁻¹ : structure déroulée de la gélatine	Huc <i>et al.</i> , 1968

Annexe 8 : Analyse en composantes principales réalisée sur les variables de TPA et de rhéologie



Annexe 9 : Courbe théorique obtenue à l'issue d'une mesure de TPA (capture d'écran du logiciel TRAPEZIUM X)

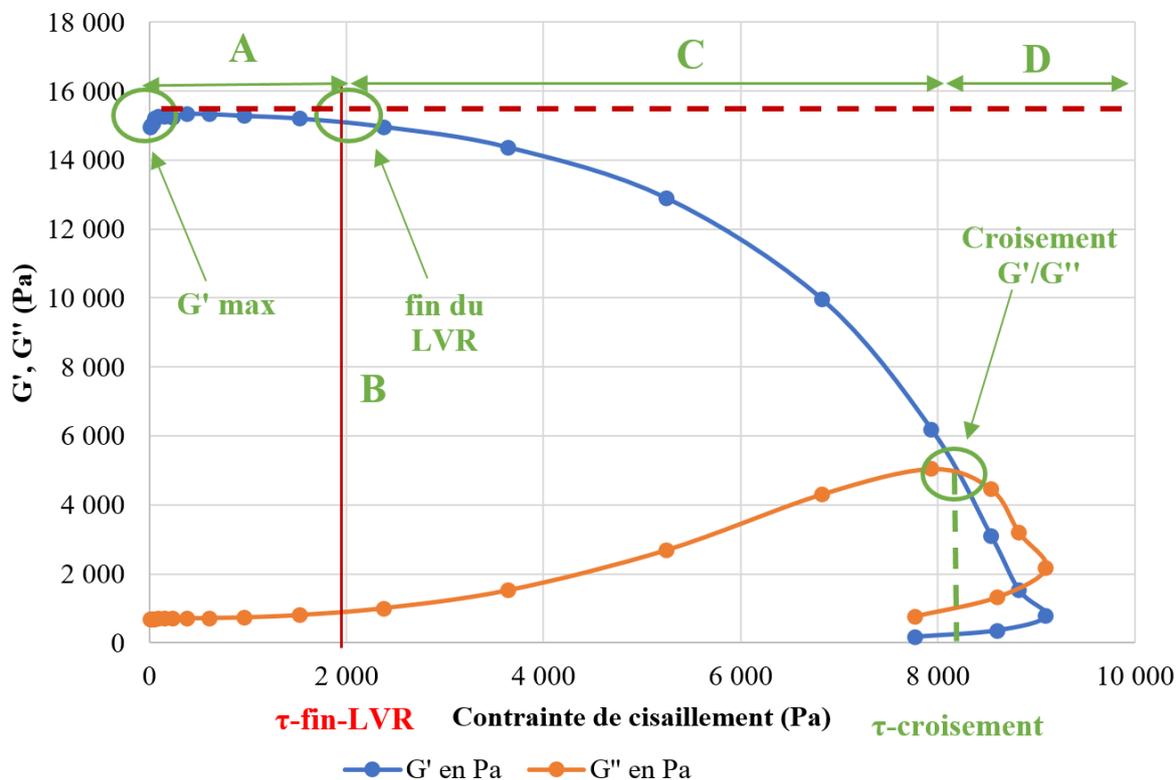


Annexe 10 : Définitions des différents paramètres de TPA mesurés

Paramètre	Correspondance sur la courbe théorique	Définition physique	Définition physiologique
Fermeté (N)	H	Force nécessaire à appliquer sur un produit pour qu'il atteigne une certaine déformation	Force nécessaire pour comprimer un solide entre les molaires
Élasticité	T2/T1	Vitesse à laquelle un produit déformé retrouve sa forme initiale après la disparition de la force de déformation qui lui était appliquée	À quel point un produit retrouve sa forme originale une fois qu'il a été comprimé entre les dents
Adhérence (J)	A3	Travail nécessaire pour vaincre les forces d'attraction entre la surface du produit et celles des outils	Force requise pour ouvrir la mâchoire après avoir mordu dans l'échantillon
Cohésion	A2/A1	Point jusqu'auquel le produit peut être déformé avant de se rompre	Degré de compression du produit entre les molaires avant qu'il ne se rompe
Masticabilité (N)	Fermeté x Élasticité x Cohésion	Énergie requise pour mastiquer un solide et le réduire dans un état qui lui permette d'être avalé	Durée nécessaire à la mastication de l'échantillon pour le réduire dans un état qui lui permette d'être avalé

Annexe 11 : Détermination des paramètres de rhéologie, exemple de la condition 125-bloom glyquée en condition sèche

- A : domaine viscoélastique linéaire (déformation élastique réversible)
- B : seuil d'écoulement
- C : zone de non-linéarité (déformation plastique irréversible)
- D : rupture de l'échantillon



 	Diplôme : Ingénieure Oniris, Master 2 NSA
Auteure : Charlotte DUMOULIN	Structure d'accueil : INRAE
Nombre de pages : 54 Annexes : 11	Adresse : Route de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle
Année de soutenance : 2022	Maître de stage : Stéphane PORTANGUEN
Titre : Étude de la variabilité de la réaction de glycation dans des gels de gélatine par une approche multi-échelle Title: A study of the variability of the glycation reaction in gelatin gels using a multiscale approach	
Résumé : Malgré plusieurs études montrant que la réaction de glycation, ou réaction de Maillard, permettrait de texturer des gels protéiques sans additifs, il semblerait que ce constat ne s'applique pas aux gels de gélatine. Nous avons souhaité déterminer si l'humidité de la gélatine sous forme de poudre et son degré Bloom ont un impact sur les propriétés de texturation de cette réaction. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de texture et de rhéologie, des observations en microscopie électronique en transmission et des analyses en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les résultats obtenus suggèrent que le Bloom et l'humidité de la gélatine ont bien un effet sur les propriétés de texturation de la glycation. L'approche multi-échelle utilisée a montré leur rôle dans la structuration des gels, notamment au niveau de leur "densité" qui peut gêner la glycation en limitant l'interaction du ribose avec les acides aminés réactifs. La quantité de liaisons hydrogène dans les gels, liée à l'humidité de la gélatine, jouerait également un rôle lors de la fixation du ribose aux sites réactifs. Nous en concluons que la variabilité des gélatines ne permet pas d'appliquer de manière généralisée la glycation à des fins de texturation sur de telles matrices.	
Abstract: Despite various studies showing that the glycation reaction, also called Maillard reaction, would be effective to texturize protein-based gels without additives, it seems that this statement does not apply to gelatin gels. We wanted to determine whether the moisture content of gelatin powder and its Bloom index have an impact on the texturizing properties of this reaction. To do so, we carried out texture and rheological measurements and conducted transmission electron microscopy observations and Fourier transform infrared spectroscopy analysis. The results suggest that the Bloom index and humidity of gelatin have indeed an effect on the texturizing properties of glycation. The multiscale approach we used showed their role in the structuring of gels, namely regarding their "density" which can hinder glycation by limiting the interactions between ribose and reactive amino acids. The amount of hydrogen bonds in the gels, related to gelatin moisture content, would also play a role in the binding of ribose to reactive sites. We concluded that the variability of gelatin does not allow for a generalized application of glycation for texturizing purposes on this kind of matrices.	
Mots-clés : Glycation, texturation, degré Bloom et humidité de la gélatine, TPA, rhéologie, spectroscopie FT-IR, MET Key Words : Glycation, texturizing, Bloom index and moisture content of gelatin, TPA, rheology, FT-IR spectroscopy, TEM	