



UNIVERSITÉ DE NANTES



Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture  
Discipline Génie des Procédés - Ingénierie chimique et agro-alimentaire  
Année 2012-2013

## Habilitation à Diriger des Recherches

# Maîtrise de la qualité des aliments, matrices multiphasiques instables et complexes

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Juliane Floury**

**Le 21 mai 2013 à l'Université de Nantes devant le jury composé de :**

- Mme Isabelle Souchon, Directrice de Recherche INRA
- Mme Nathalie Gontard, Professeure Université de Montpellier II
- M. Jean-Dominique Daudin, Directeur de Recherche INRA
- M. Taco Nicolaï, Directeur de Recherche CNRS
- M. Jack Legrand, Professeur Université de Nantes

## REMERCIEMENTS

*En premier lieu, mes remerciements vont à Sylvie Lortal et Joelle Léonil, directrices du Laboratoire de Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf de l'INRA de Rennes, qui m'ont toutes les deux soutenue et encouragée dans mon projet de recherche depuis la création de l'UMR INRA/AGROCAMPUS OUEST.*

*Je remercie vivement Jack Legrand, qui après avoir dirigé ma thèse de 1999 à 2002, a accepté de faire parti de mon jury d'habilitation en temps que représentant de l'Université de Nantes. Un grand merci également à Isabelle Souchon et Jean-Dominique Daudin pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux sur la diffusion depuis le début de ce projet, et surtout pour votre soutien et vos conseils précieux. Je vous remercie aussi, ainsi que Taco Nicolai, d'avoir accepté de rapporter ce mémoire, et Nathalie Gontard de m'accorder un peu de son temps pour participer à mon jury.*

*Bien évidemment, je tiens à remercier les étudiants que j'ai encadrés et qui m'ont permis de concrétiser ce projet de recherche. Je pense notamment à Maeva le Poullennec et à Juliana Valle. Je remercie également du fond du cœur mes collègues Marie-Hélène Famelart, Bénédicte Camier, Marie-Noelle Madec et Sophie Jeanson pour leur contribution majeure à ce travail. Je n'oublie pas non plus de remercier Gérard Brûlé, Valérie Gagnaire et Anne Thierry pour leurs précieux conseils lors de la rédaction de ce mémoire.*

*Finalement, je remercie tous mes collègues du STLO et d'AGROCAMPUS OUEST avec qui je travaille, aussi bien dans le cadre de la recherche que de l'enseignement, dans une ambiance chaleureuse et sympathique, et surtout avec un esprit d'intelligence collective remarquable : selon le proverbe africain, « Pour qu'un enfant grandisse, il faut tout un village » !*

*A la mémoire de mon père Luc et de ma chère co-directrice de thèse Anne Desrumaux, qui nous ont quittés beaucoup trop tôt,  
A ma famille, mes amours Axel, Marine et Alexis.*

# TABLE DES MATIERES

<b>GLOSSAIRE</b>	<b>5</b>
<b>1. CURRICULUM VITAE DETAILLE</b>	<b>7</b>
ETAT CIVIL ET SITUATION PROFESSIONNELLE	7
CURSUS PROFESSIONNEL, FONCTIONS EXERCEES, MOBILITES	7
FORMATIONS ET DIPLOMES	8
DISTINCTIONS	8
RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES ET ADMINISTRATIVES	9
ACTIVITES D'EXPERTISE ET D'ETUDES	9
ENCADREMENT DE LA RECHERCHE	10
ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT	11
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET VALORISATION	16
<b>2. GENESE DE L'ACTIVITE DE RECHERCHE ET ENVIRONNEMENT SCIENTIFIQUE</b>	<b>20</b>
<b>3. MAITRISE DE LA QUALITE DES ALIMENTS, MATRICES MULTIPHASIQUES INSTABLES ET COMPLEXES</b>	<b>23</b>
3.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	23
<i>De l'empirisme à la technologie raisonnée</i>	23
<i>Quelques notions sur la fabrication des émulsions</i>	24
<i>Du lait au fromage</i>	25
<i>Les apparences macroscopiques de la microstructure des aliments</i>	27
3.2. STRUCTURATION PAR HOMOGENEISATION A TRES HAUTES PRESSIONS D'EMULSIONS ALIMENTAIRES	28
3.2.1. <i>Contexte</i>	28
3.2.2. <i>Modélisation de l'écoulement dans la valve d'homogénéisation et processus de dispersion</i>	29
3.2.3. <i>Structuration des émulsions</i>	34
3.2.4. <i>Conclusion et retombées</i>	37
3.3. DYNAMIQUE DES SOLUTES ET STRUCTURE DES MATRICES	39
3.3.1. <i>Contexte</i>	39
3.3.2. <i>Bases théoriques de la diffusion</i>	40
3.3.3. <i>Réduction de la teneur en sel des aliments: étude intégrée de la libération du sel et de sa perception dans des systèmes modèles et réels.</i>	42
3.3.4. <i>Développement de nouvelles méthodologies d'exploration pour avancer dans la connaissance des mécanismes d'affinage in situ.</i>	48
● Comprendre l'affinage au niveau microscopique	48
● Collaborations équipe D2R	50
● Stratégie	52

● Principaux résultats	54
-Diffusion et activité de la nisine	54
-Développement de la technique FRAP en microscopie confocale	58
-Distribution spatiale des colonies bactériennes	68
-Les colonies et leur micro-environnement	70
<b>4. BILAN ET PERSPECTIVES</b>	<b>76</b>
4.1. BILAN	76
4.2. PROJET DE RECHERCHE	77
4.2.1. <i>Dynamique des solutés et microstructure des matrices laitières</i>	77
4.2.2. <i>Modélisation de l'action des enzymes protéolytiques immobilisées en matrice fromagère modèle</i>	84
4.3. CONCLUSION	87
<b>5. REFERENCES CITEES</b>	<b>88</b>
<b>6. ANNEXES</b>	<b>94</b>
ANNEXE 1. PUBLICATIONS D'ENSEIGNEMENT.	94
ANNEXE 2. PROCEDE INNOVANT DE STABILISATION PAR CHAMPS ELECTRIQUES PULSES DES PRODUITS LAITIERS	95

## GLOSSAIRE

<b>ACIA</b>	Association des Chimistes, Ingénieurs et Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires
<b>Adro</b>	Association pour le développement de la recherche sur les ovoproduits
<b>ALIMM</b>	Alimentation Lait Innovation Management Microbiologie
<b>AMMAC</b>	Elaborer des aliments modèles et des modèles d'aliments prenant en compte la complexité
<b>AQS</b>	Aliment Qualité Sécurité
<b>B2ISI</b>	Biodiversité Bactérienne et Interactions In Situ
<b>BBA</b>	Bretagne Biotechnologie Alimentaire
<b>BN</b>	Bioactivité et Nutrition
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine
<b>CEPIA</b>	département Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture
<b>CERMAV</b>	Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales
<b>CFD</b>	Computational Fluid Dynamics
<b>CIRM-BIA</b>	Centre International de Ressources Microbienne-Bactéries d'intérêt alimentaire
<b>CNIEL</b>	Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
<b>CSLM</b>	Confocal Laser Scanning Microscope
<b>D2R</b>	Dynamiques Réactionnelle et Diffusionnelle au sein des matrices laitières
<b>DEA</b>	Diplôme d'Etudes Approfondies
<b>DII</b>	Déshydratation par Immersion-Imprégnation
<b>DRACI</b>	Développement et Recherche en Art Culinaire Industrialisée
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ENITIAA</b>	École nationale d'ingénieurs des techniques des industries agricoles et agroalimentaire
<b>ENSA</b>	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
<b>EXECO</b>	EXploration du microEnvironnement des COLonies bactériennes en matrice laitière
<b>FCS</b>	Fluorescence Correlation Spectroscopy
<b>FITC</b>	Fluorescein IsoThioCyanate
<b>FLAVIC</b>	FLAveur, VIsion et Comportement du consommateur
<b>FRAP</b>	Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment
<b>GEPEA</b>	laboratoire de GENie des Procédés en Environnement et en Agro-alimentaire
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>IAA</b>	Industries Agro-Alimentaires
<b>IFR</b>	Institute of Food Research (Norwich, UK)

<b>INSA</b>	Institut National des Sciences Appliquées
<b>INSFA</b>	Institut National Supérieur de Formation Agroalimentaire
<b>IRM</b>	Imagerie de Résonance Magnétique
<b>ISAA</b>	Institut Supérieur d'Agro-Alimentaire
<b>ISFPL</b>	Interactions Structure - Fonctionnalités des Protéines et Lipides
<b>IUP</b>	Institut Universitaire Professionnalisé
<b>LISBP</b>	Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
<b>LRTL</b>	Laboratoire de Recherche en Technologie Laitière
<b>MICA</b>	département Microbiologie et Chaîne Alimentaire
<b>MICOV</b>	MICRObiologie de l'Oeuf et des Ovoproduits
<b>MMV</b>	Brevet Maubois-Mocquot-Vassal (1969)
<b>MRic-ALMF</b>	Microscopy-Rennes Imaging Center- Advanced Light Microscopy Facility
<b>NICE</b>	NIsin-Controlled gene Expression system
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>PEPI MACS</b>	Partage d'Expériences et de Pratiques en Informatique
<b>PRA</b>	Programme de Recherche en Alimentation
<b>PSAE</b>	Production Sécurité des Aliments et Environnementale
<b>RITC</b>	Rhodamine IsoThioCyanate
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>ROI</b>	Région Of Interest (région d'intérêt)
<b>SAME</b>	Science des Aliments et Management des Entreprises
<b>STL</b>	Science et Transformation Laitière
<b>STLO</b>	Laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'œuf
<b>TICE</b>	Technologies de l'Information et de la Communication pour l'Enseignement
<b>TIPII</b>	Transferts et Interactions dans les Procédés de l'Industrie Laitière
<b>UMR</b>	Unité Mixte de Recherche
<b>UNSW</b>	Université de Nouvelle Galles du Sud

# 1. CURRICULUM VITAE DETAILLE

## Etat civil et situation professionnelle

**Juliane Flourey, épouse Jordan**

Née le 21 juin 1976 à Brest (29)

Mariée, 2 enfants.

Situation professionnelle actuelle : Maître de conférences de **classe normale titulaire**, échelon 5 (avril 2012)

Nomination : **1<sup>er</sup> septembre 2003 ; CNECA 3**

Etablissement : **AGROCAMPUS OUEST** - Département agroalimentaire

UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'œuf INRA-AGROCAMPUS

65 rue de Saint-Brieuc ; CS 84215

35 042 RENNES Cedex

☎ 02 23 48 54 52, ☎ 02 23 48 55 78

✉ [Juliane.Flourey@agrocampus-ouest.fr](mailto:Juliane.Flourey@agrocampus-ouest.fr)

## Cursus professionnel, fonctions exercées, mobilités

**Mars – août 1999** Etude d'un **procédé d'extraction liquide-liquide à membranes de composés d'arômes appliqué aux émulsions alimentaires.**

(6 mois)

Stage de fin d'études au centre de recherche fondamentale d'UNILEVER à Vlaardingen (Pays-Bas). Encadrement : A. Baudot, H. Smorenburg et W. Agterof.

- *Amélioration du procédé et caractérisation rhéologique et physico-chimique des milieux modèles (fluides newtoniens et rhéofluidifiants)*
- *Modélisation du transfert de matière appliquée à l'extraction liquide-liquide à membranes*

**Oct 1999- oct 2002** Etude de la **structuration par homogénéisation à très hautes pressions (jusqu'à 350 MPa) d'émulsions alimentaires.** Thèse cofinancée Région des Pays de la Loire - Ecole Nationale des Industries et des Techniques des Industries Agro-Alimentaires (ENITIAA)

(36 mois)

- *Effet des hautes pressions dynamiques sur la structure et la texture de systèmes dispersés et de leurs constituants (émulsions, polymères, protéines).*
- *Modélisation de l'écoulement (CFD) et analyse des mécanismes de fractionnement des gouttelettes d'huile (cisaillement, turbulence, cavitation).*
- *Contrat industriel avec les Fromageries Bel et Bel Industrie.*
- *Vacations à l'ENITIAA : TP « Opérations Unitaires », TD « Emulsions ».*

Nov 2002

-SEPT 2003

(10 mois)

**Maître de conférences contractuel** à l'ENSA et l'INSFA de Rennes.

**Enseignement en génie des procédés alimentaires** (temps complet)

- *Cours magistraux : génie des bioréacteurs, techniques séparatives sur membranes*
- *Travaux pratiques : technologie fromagère, opérations unitaires*
- *Travaux dirigés : génie des procédés, phénomènes de transferts*

DEPUIS SEPT  
2003

**Maître de conférences** à **AGROCAMPUS OUEST** (site de Rennes)

**Enseignement en génie des procédés alimentaires** pour les ingénieurs agronomes et agro-alimentaires.

▪ **Cours magistraux :**

- *génie enzymatique et fermentaire (bioréacteurs),*
- *techniques de séparation mécanique : filtration tangentielle, décantation et centrifugation,*
- *techniques de stabilisation microbiologique des aliments*
- *procédés de stabilisation des systèmes dispersés (émulsions, mousses)*

- *procédés d'agitation, de mélange et d'émulsification.*

- **Travaux pratiques** : technologie fromagère, approfondissement en génie des procédés
- **Travaux dirigés** : génie des procédés, autopsie d'une installation industrielle.

**Juin 2005-  
juin 2006** **Séjour post-doctoral** dans l'équipe modélisation, contrôle et optimisation du Département Génie Chimique de l'**Université de Nouvelle Galles du Sud (UNSW) en Australie** (collaboration avec Pr. T. Pham et Pr. A. Le Bail) pour **améliorer mes compétences en modélisation mathématique** :

- *Maîtrise des lois régissant les phénomènes de transferts et de la mise en équation de ces phénomènes pour modéliser un processus donné ;*
- *Apprentissage des méthodes numériques et des méthodes d'optimisation nécessaires à la résolution des équations mathématiques complexes (Matlab et COMSOL Multiphysics);*
- *Application à la modélisation des phénomènes de transfert de solutés dans des matrices alimentaires; prise en compte de l'échelle cellulaire et des transferts intra-extra cellulaires.*

## Formations et diplômes

- 1999**
- **Ingénieur de l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA)** de Toulouse, spécialité « Génie Biochimique et Alimentaire »
  - Spécialisation à l'Institut Supérieur d'Agro-Alimentaire (**ISAA**) en « Sciences et Procédés Alimentaires » à l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon.
  - **DEA** en parallèle, mention B

---

**2002** **Docteur de l'Université de Nantes**, discipline « Mécanique, Energétique et Génie des Procédés », option « Génie des procédés » - Mention *très honorable avec les félicitations du jury*  
**Titre de la thèse: Structuration par homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions alimentaires**  
Laboratoire : GEPEA UMR-CNRS 6144, ENITIAA de Nantes  
Directeur de thèse : J. LEGRAND ; Co-encadrement : A. DESRUMAUX

---

**2004** **Formation pédagogique des Enseignants Chercheurs**, organisée par M. Gogny à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. 4 semaines.

**2008** **Séminaire Réflexives®, Linguistique et Pratiques de Recherches**, organisé par Marie-Claude Rolland. 1 semaine en immersion avec ma doctorante S. Aly.

**2011** **Formation « Introduction au traitement de données expérimentales avec R »**, Kuzulia, Agrocampus Ouest, Rennes. 1 jour.

**2012** **Formation à « l'analyse d'image de microscopie optique »**, plate-forme de microscopie MRic-ALMF de Villejean, Rennes. 4 jours.

**Ecole thématique « initiation à la modélisation »**, PEPI Mathématiques Appliquées et Calcul Scientifique (INRA), La Rochelle. 5 jours.

## Distinctions

- **Prix de la meilleure présentation CV Planètes jeunes** (2500 F), Congrès de Génie des Procédés 2001, Nancy 17-19 octobre 2001.
- **Prix « Marcel Loncin » 2004** (2000 Euros), remis par l'Association des Chimistes, Ingénieurs et Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires (ACIA) pour mes travaux de recherche en Génie des Procédés Alimentaires, Rencontres AGORAL, Nantes 1<sup>er</sup> décembre 2004.
- **Médaille de la Ville de Rennes**, remise le 5 janvier 2005 à l'occasion des vœux du Maire aux responsables de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



## Responsabilités scientifiques et administratives

### **Majeures**

- **Membre élue** du collège des Maîtres de Conférences au **Conseil d'Administration (titulaire)** de 2008 à 2012. Je faisais notamment partie dans ce cadre des commissions « Finance et Budget » et d'attribution des « Primes pour Charges Administratives » du CA. J'ai également participé au panel d'évaluation AERES d'AGROCAMPUS OUEST en 2011 en tant qu'élue CA.
- **Membre élue (suppléante) de la CNECA 3** dans le collège des Maîtres de Conférences depuis 2010. Dans ce cadre, je rapporte tous les ans des rapports quadriennaux de Maîtres de Conférences en binôme avec un autre élu MC de cette CNECA.
- **Responsable de la spécialisation ingénieurs (niveau Master 2) en Science des Aliments et Management des Entreprises (SAME)** des formations agronome et agroalimentaire d'AGROCAMPUS OUEST depuis début 2012.
- **Responsable du Team 4 dans le Programme de Recherche en Alimentation sur le sel** de 2005 à 2008, coordonné par C. Salles. Budget Team 4 : 40 000€/240 000€ (budget total).

### **Autres**

- Membre élue au Conseil des Enseignants (suppléante) entre 2006 et 2008.
- **Membre élue au Conseil des Enseignants (titulaire) depuis 2012.**
- Membre du pôle « Agriculture, Environnement et Territoires » entre Rennes et Angers au sein du Grand Etablissement d'AGROCAMPUS OUEST depuis sa création en 2008.
- Membre titulaire des jurys de concours pour l'entrée en 1<sup>e</sup> ou 2<sup>e</sup> INSFA (2005, 2008).
- Membre suppléante du jury de concours au niveau L2 de la formation agroalimentaire (ex INSFA) depuis 2010.

## Activités d'expertise et d'études

- **Examinatrice de la thèse de Clémentine LAUVERJAT-RESSAIRE**, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Ecole Doctorale ABIES. Sujet : Mobilité des petits solutés (sel et composés d'arôme) dans des matrices lipoprotéique : influence de la structure des matrices - 24 Février 2009.
- **Membre titulaire du jury de concours d'un Maître de Conférences** en « Génie des Procédés Séparatifs » à AgroParisTech – 18 et 19 mai 2011.
- **Referee pour différentes revues** (Journal of Dairy Science, LWT-Food Science and Technology, Journal of Food engineering, Microfluidics and Nanofluidics).
- **Membre du comité de pilotage de la thèse de C. le Boucher (2011-2014)** : Exploration du fromage du gène aux métabolites. Thèse réalisée au STLO sous la direction de S. Lortal et S. Jeanson.
- **Participation au contrat de prestation entre la Société Bongrain-Gérard et l'INRA (UMR-STLO)** « Défauts de croûte de fromages UF » avec la SOREDAB (Société de Recherches et de Développement Alimentaire BONGRAIN). 1 CDD de 6 mois + 5000 € de fonctionnement (2006-2007)
- **Participation au projet CHEESOMIC** : « Développement de méthodes à haut débit appliquées à l'expression *in situ* du potentiel microbien dans les fromages » en collaboration avec BBA et animé par le PAO (Pôle Agronomique Ouest). Coût total de l'étude : 531 301€ sur 3.5 ans, financée par les Régions Bretagne et Pays-de-la-Loire (2011-2014).

## Encadrement de la recherche

### **Stages de fin d'études (DUT – Licence – Master)**

Au cours de ma thèse, j'ai pu encadrer deux stages de fin d'études (2 mois) de l'Institut Universitaire de Technologie de Quimper pour l'obtention du DUT « génie biologique », option Industries Alimentaires et Biologiques. Leurs stages portaient sur divers aspects du procédé d'homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions alimentaires.

En 2004, j'ai encadré le **stage de fin d'étude d'Elodie Lainé** (2 mois) pour l'obtention du DUT « Génie chimique - génie des procédés », option : bioprocédés, de l'IUT de Saint-Nazaire sur les effets du couplage traitement thermique/champs électriques pulsés sur l'inactivation microbienne de *Salmonella enteritidis* inoculée dans du lait cru. **Les résultats de ce stage ont été valorisés dans la publication n°9.**

En 2007, j'ai encadré **Maéva Le Poullennec** pour son stage de fin d'étude de Licence de Chimie de l'Université de Rennes (3 mois). Son stage portait sur la modélisation du transfert de sel dans des matrices fromagères modèles et a donné lieu à la **rédaction de la publication n°13.**

En 2011, j'ai encadré **Guillaume Lollia**, étudiant en **Master 2 Physique et Photonique** à l'Université Rennes 1. L'objectif de son stage de M2 (6 mois) était de déterminer les coefficients de diffusion de solutés fluorescents de taille variable dans des matrices fromagères modèles de structures différentes par la technique de FRAP en microscopie confocale.

### **Encadrement doctoral et suivi postdoctoral**

**De 2008 à 2011**, co-encadrement (40%) avec S. Jeanson (IE, 40%) de la **thèse de Samar Aly**, financée par le Gouvernement Egyptien (directrice S. Lortal, 20%), portant sur la diffusion et l'activité de la nisine en matrice fromage modèle. Malgré les difficultés liées à la langue – Samar ne parlant pas un mot de français en arrivant – et aux différences de cultures, **cette thèse a permis la publication de trois articles (n°14, 16 et 18)**. La soutenance a eu lieu le 4 juillet 2011 devant le jury suivant : J.-D. Daudin (INRA UR QuaPA, Clermont-ferrand) et C. Lacroix (Institut de l'alimentation, la nutrition et la santé, Zürich, Suisse), Rapporteurs, M. Gautier (Agrocampus Ouest), Président, J. Van Impe (Katholieke Universiteit Leuven, Belgique), Examineur, S. Lortal (INRA UMR STLO), Directrice de thèse. A son retour en Egypte, Samar a obtenu un poste de Maître de Conférences en Technologie et Microbiologie Laitière à l'Université de Tanta.

#### **Depuis 2011-**

- Co-encadrement (80 %) avec S. Lortal (Directrice) de **Juliana Valle Costa Silva** (étudiante brésilienne de formation ingénieur agroalimentaire) dans le cadre d'une thèse portant sur la modélisation du transfert de solutés en matrice laitière qui a démarré **en octobre 2011**.
- suivi du travail d'un **post-doctorant, Paulo de sa Peixoto**, avec A. Bouchoux (CR) et G. Gesan-Guiziou (DR-équipe TIPIL). L'objectif principal de ce post-doc est d'évaluer les répercussions des forces de cohésion mises en jeu entre les micelles de caséines lorsqu'elles sont concentrées, sur les propriétés des gels formés (réversibilité, structure, perméabilité et affinité vis-à-vis des solutés). En effet, la compréhension du comportement des fluides alimentaires en milieu concentré est un pré-requis indispensable pour maîtriser les opérations de concentration, souvent conduites de façon empirique au niveau industriel, et envisager le développement de nouveaux procédés "éco-conçus". Les gels de caséines sont analysés dans différentes conditions physico-chimiques par "décompression osmotique" afin de déterminer l'évolution des propriétés des gels qui en découlent et les cinétiques de

réversibilité / propriétés sur des durées de plusieurs heures. De telles informations conduiront à une meilleure compréhension du comportement des gels /solides formés à partir de caséines, et devraient déboucher sur des propositions de conduite des procédés: par exemple des propositions de conduite pour limiter et/ou éliminer les gels de caséines, ou encore favoriser le transfert de petits solutés au travers de ces structures dans le cas de la filtration. J'interviens notamment dans ce projet au niveau de la mise au point de la technique de FRAP afin de modéliser le transfert de solutés dans les concentrés de caséines. **Les résultats de ce projet sont en cours de valorisation sous forme d'article (Publication N°21) et ont fait l'objet de deux communications orales dans des congrès internationaux (N°41 et 42).**

## Activités d'enseignement

AGROCAMPUS OUEST regroupe deux formations d'ingénieurs sur le site de Rennes, l'une en agronomie et l'autre en agroalimentaire. Ce campus dispense également des formations de licence professionnelle ou de type masters en co-habilitation avec d'autres institutions (Université de Rennes 1). Au sein de ces formations, l'enseignement de l'agroalimentaire occupe une place d'importance comme l'atteste le flux d'étudiants ayant choisi une spécialisation construite autour de l'agroalimentaire (environ 100 diplômés par an) et des opportunités d'emploi associées. Le secteur des industries agroalimentaires constitue l'un des débouchés principaux pour les étudiants d'AGROCAMPUS OUEST (CFR de Rennes).

Le département Agroalimentaire est chargé de la spécialisation ingénieurs en Science des Aliments et Management des Entreprises (SAME) sur le campus à partir du M1. Les 12 enseignants et 7 AITOS du département sont répartis sur trois champs disciplinaires : génie alimentaire, science des aliments et microbiologie. Les enseignants du département couvrent ainsi l'essentiel des disciplines relevant du secteur agro-alimentaire : génie des procédés et technologie alimentaire, physico-chimie et science des aliments, chimie analytique, nutrition, microbiologie et hygiène alimentaire.

La formation en agroalimentaire s'inscrit dans un ensemble recherche-enseignement-développement dont la mission est de contribuer à l'acquisition et à la diffusion du progrès technique et scientifique. Les recherches conduites au sein du département concernent les ovoproduits et les produits laitiers dans le cadre d'une UMR INRA-AGROCAMPUS OUEST avec le laboratoire de Science et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO), qui possède une reconnaissance nationale et internationale. Le partenariat avec des structures de développement et des professionnels (VALORIAL, Actilait, BBA, CNIEL, Adro Ouest, etc.) est très développé car il facilite le transfert des acquis de la recherche et permet de bien appréhender le contexte technico et socio-économique du secteur agroalimentaire auquel se destinent les étudiants.

## Participation à l'enseignement de l'Etablissement

Spécialisée en génie des procédés, je m'investis, aux côtés de R. Jeantet et de C. Le Floch (recrutée en 2010), dans l'enseignement de génie alimentaire et de technologie générale dans l'ensemble des cursus ingénieurs et masters. Cet enseignement concerne les bases de génie des procédés relatives aux transferts de chaleur, de matière et de quantité de mouvement, et plus généralement aux transferts couplés et aux aspects thermodynamiques mis en œuvre au cours des opérations unitaires classiquement rencontrées dans l'industrie agroalimentaire. Je suis plus particulièrement en charge des aspects de séparation/concentration des liquides alimentaires par filtration tangentielle et par décantation, ainsi que des procédés mécaniques de mélange et d'homogénéisation des systèmes dispersés (émulsions, mousses). Je suis également responsable de l'enseignement du génie des bioréacteurs enzymatiques et

microbiens au niveau M2, et de l'enseignement du génie des procédés de la formation agroalimentaire au niveau L2.

Je participe largement à l'organisation des travaux dirigés d'« approfondissement en génie des procédés alimentaires » dispensés au niveau M2 en spécialisations ingénieurs SAME et Halieutique ainsi que pour les masters ALIMM. J'interviens dans les modules de « technologie générale », de « génie industriel » dispensés au niveau L3.

La problématique environnementale et la notion de durabilité des filières me préoccupant énormément depuis plusieurs années, j'ai pris la responsabilité d'un module « Environnement et Entreprises » en 2008, et j'ai mis en place un nouveau module, dont je suis également responsable, autour du développement durable appliqué à l'industrie agro-alimentaire en 2010 (niveau M1).

Enfin, je m'occupe également de l'encadrement des projets d'ingénieurs en M2 (2 par an). J'interviens au niveau du suivi des étudiants en stage en entreprises et de leurs évaluations.

Ma charge d'enseignement est d'environ 250 h eqTD/an dont 170 h eq.TD sous forme de cours-TP-TD en génie alimentaire. Les intitulés des modules et leurs volumes horaires respectifs sont présentés ci-après :

▪ **Technologie générale**

*Module obligatoire pour Ingénieurs agronomes L3, Master ; 150-180 étudiants ; 22 h cours + 6h TD + 2h examen.*

▪ **Technologie générale et Bases du génie des procédés dans les IAA**

*Modules obligatoires pour Ingénieurs agroalimentaires L2, 50 étudiants ;*

- 35 h cours + 2h TD + 6h visites + 2h examen
- 32 h cours + 2h examen + 1 visite.

▪ **Technologie - Génie Industriel**

*Module obligatoire pour Ingénieurs agro-alimentaire L3, 50 étudiants ; 44 h cours (et/ouTD) + 2h examen + exposés de technologie (16h ; 8 groupes) + visites (16 h).*

▪ **Approfondissement en génie alimentaire**

*Module obligatoire pour Ingénieurs SAME M2 (parcours PSAE et STL) et pour les Master 2 ALIM+Ingénieurs agronomes spé halieutique;*

*SAME : 30 étudiants ; 36 h cours-TP + rapport et soutenance orale.*

*ALIM+Agronome spé halieutique : env. 20 étudiants ; 16 h cours-TP + rapport et soutenance orale.*

▪ **Génie enzymatique et microbien**

*Module obligatoire pour Ingénieurs SAME M2 (parcours PSAE ou R&D), 15-20 étudiants ; 10 h cours – 20 TP + rapports de TP.*

## Démarche pédagogique

Fortement encouragée par notre Direction Générale, j'ai pu m'impliquer activement, et ce dès mon recrutement en temps que Maître de Conférences stagiaire, dans la **formation pédagogique des enseignants-chercheurs** organisée par M. Gogny à l'Ecole Vétérinaire de Nantes (janvier à novembre 2004). Je pense que cette formation m'a été très utile pour savoir comment passer du rôle de simple « transmetteur de savoir » (logique de connaissances), au rôle de formateur de futurs cadres compétents dont la mission principale est de **transmettre du « savoir-faire »** (logique de compétences).

Cette démarche pédagogique, basée sur une logique de compétences, a récemment été reprise par la Direction des Formations du CFR de Rennes, qui mobilise depuis la rentrée 2010 l'ensemble de la communauté enseignante pour **réformer en profondeur le cursus des ingénieurs agronomes pour la rentrée 2012**. Dans ce cadre, j'ai participé aux différents séminaires pédagogiques organisés 2 fois par an

pour réfléchir aux nouvelles formes pédagogiques à proposer aux étudiants, ainsi qu'au contenu des nouvelles Unités d'Enseignements. J'ai plus particulièrement participé, avec mes collègues du Génie Rural, à la **refonte des modules de physique appliquée et de technologie alimentaire**, qui jusqu'à présent étaient totalement déconnectés, en un seul bloc d'enseignement de physique appliquée. Cela permettra d'éviter les redondances dans la présentation des différentes lois physiques, d'adopter un vocabulaire commun et de faire d'avantage le lien entre ces lois fondamentales et leurs applications, d'une part dans le domaine de la physique de l'environnement et celui du génie des procédés alimentaires.

Et surtout, **j'ai participé avec le comité de pilotage de cette réforme pédagogique, à la phase de construction du nouveau référentiel de compétences** du cursus ingénieur agronome. Pour cela, nous avons, en binôme, interrogé d'anciens étudiants d'AGROCAMPUS exerçant leurs fonctions de cadre dans différentes organisations et/ou entreprises. Nous étions entre autre chargés de les questionner de manière approfondie au sujet d'une situation significative du niveau d'intervention d'un ingénieur dans leur organisation. En d'autres termes, il s'agissait d'explicitier une situation de référence révélatrice de l'ensemble des compétences mobilisées par la personne pour agir de manière pertinente par rapport à son « métier ». A partir de ces entretiens, nous avons effectué de nombreuses séances d'analyse des différentes situations professionnelles pour en dégager les ressources nécessaires à mobiliser pour répondre à la finalité de l'action, et donc les compétences nécessaires à la « posture » d'ingénieur.

D'un point de vue personnel, j'ai trouvé ce **travail très intéressant** bien que chronophage, et même si j'éprouve encore des difficultés à mettre en relation démarche pédagogique et acquisition de compétences, **ces entretiens m'ont permis de mieux cerner les attentes des professionnels au niveau de la formation de nos futurs ingénieurs agronomes et agroalimentaires.**

Dans l'ensemble, nous essayons au maximum, mes collègues et moi-même d'intégrer les principes de cette démarche pédagogique basée sur une logique de compétences dans nos différents enseignements de génie alimentaire.

## **Encadrement d'étudiants pour l'enseignement (hors activités de recherche)**

### **Projets de fin d'études et/ou d'initiation à la R&D**

Individuellement ou en collaboration avec des collègues du Département Agroalimentaire, **j'encadre des projets d'initiation à la recherche (2 par an)** destinés aux ingénieurs SAME (annexe 2). Ces projets, **menés en collaboration avec une entreprise de la filière agroalimentaire**, permettent aux étudiants de mettre en pratique les bases théoriques dans un contexte concret, puisque nous recherchons auprès des industriels des sujets qui les intéressent. Cet enseignement par projet est très important dans la formation d'un futur ingénieur car il favorise la réflexion personnelle et collective, la prise d'initiative, le développement de l'esprit scientifique et la rigueur au travers d'une mise en situation « professionnelle ».

Dans le cadre d'une **valorisation de l'expérience**, souvent très riche, acquise par les étudiants en 3<sup>e</sup> année de la formation agroalimentaire au cours du stage en entreprise, **j'encadre un groupe de 6 à 8 étudiants** responsables d'un thème à caractère transversal pour faire une exploitation collective de toutes ces expériences. Les thèmes choisis sont applicables à l'ensemble des stages et ont pour objet de les valoriser dans leur ensemble (ex : la démarche qualité en entreprise agroalimentaire, la fonction de production, la communication en IAA, la relation entreprise et grande distribution, le lancement d'un nouveau produit, environnement et entreprise agroalimentaire, etc...). L'enseignant responsable d'une thématique aide le groupe à rédiger un rapport écrit de synthèse et à préparer une soutenance suivie d'un débat ayant lieu en fin d'année.

### **Suivi et évaluation de stages en entreprises**

Par ailleurs, comme toutes les formations d'ingénieurs ou de troisième cycle, AGROCAMPUS inclue de plus en plus de périodes de stages en entreprises dans ses cursus. Nous sommes souvent, pour les étudiants, le premier interlocuteur externe à l'entreprise et avons, par conséquent, un rôle de conseiller. Je suis également associée à l'évaluation des rapports de stages et à leur restitution orale à hauteur de 8 à 9 rapports de stage L3 agroalimentaire, 4 à 5 rapports de stage à l'étranger niveau M1 et une dizaine de rapports de stage de fin d'études ingénieur SAME ou de Master 2 ALIMM par an.

## Participation à l'enseignement hors de l'établissement (en France)

J'ai participé aux enseignements de technologie alimentaire pour les étudiants de la **licence professionnelle DRACI** (Développement et Recherche en Art Culinaire Industrialisée) de l'Université Rennes 1, sur les aspects Réfrigération/Congélation (3h de cours) jusqu'à mon détachement en Australie. En 2004, j'ai remplacé Anne Desrumaux pour son cours d'extrusion alimentaire qu'elle dispensait depuis plusieurs années aux premières années de **l'IUP Génie Biologique de l'Université Rennes 1** (3 h de cours). Pour la même raison, je suis intervenue en octobre 2004 dans la **formation inter-entreprise Archimex** (Vannes), portant sur les émulsions et les mousses (formulation, propriétés et interfaces, stabilité, caractérisation et contrôle). L'objectif de cette intervention (7h), intitulée « Emulsions foisonnées : formulation, mise en œuvre et caractérisation », était de faire comprendre aux industriels présents comment cerner les principaux paramètres qui gouvernent le foisonnement, et plus précisément de souligner l'effet combiné important des paramètres formulation et procédés.

Depuis la rentrée **2008**, j'interviens dans trois modules du **Master ALIMM** (Alimentation Lait Innovation Management Microbiologie), cohabilité AGROCAMPUS OUEST, Université rennes 1. Spécialité à visée professionnelle, ce Master a pour ambition de répondre aux enjeux de l'industrie agro-alimentaire, et de l'accompagner dans son évolution, en formant des acteurs et gestionnaires de l'innovation. En ce qui me concerne, j'interviens au niveau M1 dans les **Unités d'Enseignement de Génie Physique et Biologique** pour la partie partant sur le génie microbiologique et enzymatique (10 h de cours-TD, 25 étudiants) et de **Sciences et Technologies des Aliments** sur la partie stabilisation des systèmes dispersés (émulsions, mousses) (3 h de cours, 45 étudiants). Je suis également responsable des **travaux pratiques d'approfondissement en génie des procédés** qui ont lieu au niveau M2 à auteur de 16h eq. TD.

## Création de documents pédagogiques et publications d'enseignement

En début de cours, chaque étudiant dispose de l'ensemble des diapositives qui seront projetées afin que l'attention des élèves soit optimale. Pour certains enseignements, un document rédigé est distribué et/ou des ouvrages ou chapitres d'ouvrages de référence qui supportent l'enseignement dispensé sont conseillés (annexe 1).

J'ai **participé à la rédaction de plusieurs chapitres d'un ouvrage de support à l'enseignement édités par Tec&Doc**, intitulé « Science des aliments : Biochimie, Microbiologie, Procédés, Produits » (2006) et qui a obtenu le Prix Roberval en 2008 (mention enseignement supérieur). Les deux volumes de cet ouvrage ont été coordonnés par des enseignants du Département Agroalimentaire (R. Jeantet, G. Brulé, T. Croguennec) et un ingénieur du laboratoire INRA STLO (P. Schuck).

Je suis également **co-auteur avec R. Jeantet du module de filtration tangentielle de la plateforme de téléformation d'AGROCAMPUS OUEST (TICE)**. L'axe agroalimentaire de ce campus numérique propose une série de modules, d'une part en sciences des aliments et des procédés industriels, et d'autre part en gestion et en marketing. Ces modules permettent à des étudiants des filières agroalimentaires (formation

initiale) et à des agents de maîtrise ou des cadres des secteurs publics et privés (formation continue) de développer une double compétence.

## **Réflexions par rapports aux activités d'enseignement**

L'enseignement de génie des procédés apparaît souvent difficile et très théorique aux étudiants. Les séances d'expérimentation sur matériel pilote n'ont lieu qu'en fin de cursus, et ce seulement pour les étudiants de certaines spécialités d'ingénieurs. Nous souhaiterions avec mes collègues R. Jeantet et C. Le Floch pouvoir mettre en place des séances de travaux pratiques dès la 2<sup>e</sup> année du cursus ingénieur agroalimentaire, afin que les étudiants puissent mieux comprendre les opérations unitaires du génie alimentaire et les phénomènes physiques impliqués.

En plus des évolutions permanentes en matière de contenu des enseignements que demande notre métier, j'ai aussi la volonté de participer à la formation continue et en entreprises, car elle constitue une bonne opportunité pour identifier les problématiques et les grandes orientations du secteur en temps réel. Parallèlement, elle permet de se faire connaître des industriels, ce qui facilite la mise en place de projets d'intérêt commun de recherche et de développement.

Enfin, à la rentrée 2012, j'ai pris la responsabilité de la spécialisation ingénieurs en Science des Aliments et Management des Entreprises (SAME) des formations agronome et agroalimentaire.

## Publications scientifiques et valorisation

### Revue internationale à comité de lecture

1. J. FLOURY, A. DESRUMAUX & J. LARDIERES (2000). Effect of high-pressure homogenisation on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **1** 127-134.
2. BAUDOT, J. FLOURY & H.E. SMORENBURG (2001). Liquid-liquid Extraction of Aroma Compounds with Hollow Fiber Contactor, *AIChE Journal.*, **47** (8) 1780-1793.
3. J. FLOURY, A. DESRUMAUX, M.A.V. AXELOS & J. LEGRAND (2002). Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation, *Food Hydrocolloids*, **16** 47-53.
4. J. FLOURY, A. DESRUMAUX & J. LEGRAND (2002). Effect of ultra-high pressure homogenization on the structure and the rheological properties of soy protein stabilized emulsions, *Journal of Food Science*, **67**(9) 3388-3395.
5. J. FLOURY, A. DESRUMAUX, M.A.V. AXELOS & J. LEGRAND (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier, *Journal of Food Engineering*, **58** (3) 227-238.
6. J. FLOURY, J. BELLETTRE, J. LEGRAND & A. DESRUMAUX (2004). Analysis of a New Type of High Pressure Homogenizer. A. Study of the Flow Pattern, *Chemical Engineering Science*, **59** (4) 843-853.
7. J. FLOURY, A. DESRUMAUX & J. LEGRAND (2004). Analysis of a New Type of High Pressure Homogenizer. B. Study of Droplet Break-up and Recoalescence. *Chemical Engineering Science*, **59** (6) 1285-1294.
8. J. FLOURY, N. GROSSET, N. LECONTE, M. PASCO, M.-N. MADEC & R. JEANTET (2006). Continuous milk processing by pulsed electric field at non lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *LAIT*, **86** (1) 43-57.
9. J. FLOURY, N. GROSSET, E. LESNE & R. JEANTET (2006). Continuous processing of skim milk by a combination of pulsed electric fields and conventional heat treatments: does a synergetic effect on microbial inactivation exist? *LAIT* **86** (3) 203-211.
10. J. FLOURY, J. CARSON & Q.T. PHAM (2007). Modelling thermal conductivity in heterogeneous media with the Finite Element Method. *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-007-0001-6.
11. J. FLOURY, A. LE BAIL & Q. T. PHAM (2008). A three-dimensional numerical simulation of the osmotic dehydration of mango and effect of freezing on the mass transfer rates, *Journal of Food Engineering*, **85**, 1-11.
12. J. FLOURY, B. CAMIER, F. ROUSSEAU, C. LOPEZ, J.-P. TISSIER, M.-H. FAMELART (2009) Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure–texture relationships. *LWT - Food Science and Technology*, **42** (10) 1611-1620.
13. J. FLOURY, O. ROUAUD, M. LE POULLENNEC, M.-H. FAMELART (2009) Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT - Food Science and Technology*, **42** (10) 1621-1628.
14. J. FLOURY, S. JEANSON, S. ALY, S. LORTAL (2010) Determination of diffusion coefficients of small solutes in cheese: a review. *Dairy Science and Technology*. **90**, 477–508.
15. S. JEANSON, J. CHADŒUF, M.-N. MADEC, S. ALY, J. FLOURY, T.F. BROCKLEHURST, S. LORTAL (2011). Spatial Distribution of Bacterial Colonies in a Model Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(4), 1493-1500.



16. S. ALY, J. FLOURY, M.-H. FAMELART, M.-N. MADEC, D. DUPONT, Y. LE GOUAR, S. LORTAL, S. JEANSON **(2011)**. Nisin quantification by ELISA allows the modeling of its apparent diffusion coefficient in model cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9484–9490.
17. J. FLOURY, M.-N. MADEC; F. WAHARTE; S. JEANSON; S. LORTAL. **(2012)**. First assessment of diffusion coefficients in model cheese by Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP). *Food Chemistry*, 133, pp. 551-556
18. S. ALY, J. FLOURY, M. PIOT, S. LORTAL, S. JEANSON **(2012)**. The nisin efficacy in cheese cannot be predicted by its concentration. *Food Microbiology*, 32, 185-190.
19. J. FLOURY, S. JEANSON, M.-N. MADEC, S. LORTAL **(sous presse)**. Porosity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LD61 colonies immobilized in model cheese. *International Journal of Food Microbiology*.
20. J. VALLE COSTA SILVA, P. DE SA PEIXOTO, S. LORTAL, J. FLOURY **(accepté)**. Diffusion behaviors of globular proteins and linear polymers in a model cheese matrix, *Journal of Dairy Science*.
21. P. DE SA PEIXOTO, A. BOUCHOUX, J. FLOURY, M.-N. MADEC, G. GESAN-GUIZIOU **(en préparation)**. Tracer diffusion in dispersions of microgel particles. *Macromolecules*.
22. S. JEANSON, J. FLOURY, A. A. ISSULAH, M.-N. MADEC, A. THIERRY, S. LORTAL. **(en préparation)**. Do microgradients of pH occur around lactococci colonies in cheese? *Applied and Environmental Microbiology*.

### **Conférences internationales avec comité de lecture et publication des actes**

23. J. FLOURY, A. DESRUMAUX & J. LEGRAND\*, Degradation of a Polysaccharide by High Shear Forces during Ultra-High Pressure Homogenisation (350 MPa), 6e World Congress of Chemical Engineering, 23-27 **septembre 2001**, Melbourne, Australie.
24. J. FLOURY\*, A. DESRUMAUX, J. LEGRAND & M.A.V. AXELOS, Effet de l'homogénéisation à très haute pression sur les propriétés physico-chimiques d'un polymère : la méthylcellulose, 8<sup>e</sup> Congrès Francophone de Génie des Procédés, Récents progrès en génie des Procédés, N° 84 vol15 Editions Tec et Doc Lavoisier, 17-19 **octobre 2001**, Nancy, France.
25. H. BOUAIQUINA, J. FLOURY, A. DESRUMAUX, J. LEGRAND\*, Ultra High Pressure Homogenization (350 MPa) as a way to modify functional properties of food macromolecules in Proceedings of Technological Innovation and Enhancement of Marginal Products, Ceverini Carla, D. Pili Teresa, Giuliani Roma, p 352-358, 6-8 **avril 2005**, Foggia, Italie **(conférence invitée)**.
26. J. FLOURY, Q. T. PHAM\* & A. LE BAIL, A Comsol Simulation of the Osmotic Dehydration of Mango, FOODSIM 2006, 17-19 **juin 2006**, Naples, Italie.

### **Conférences nationales avec comité de lecture et publication des actes**

27. DESRUMAUX, J. LARDIERES & J. FLOURY, Utilisation d'un nouvel homogénéisateur très hautes pressions pour texturer des émulsions alimentaires, Rencontres Agoral 2000 : Douzièmes Rencontres Scientifiques et Technologiques des Industries Alimentaires. 22 et 23 **mars 2000** - Montpellier. Editions Tec et Doc Lavoisier (poster).

### **Conférences nationales sans comité de lecture et publication des actes**

28. J. FLOURY, Q. T. PHAM & A. LE BAIL, Modeling the Coupled Mass Transfer Phenomena During Osmotic Dehydration of Fresh and Frozen Mango Tissues, Proceedings of the COMSOL Users Conference 2006, Paris, 7 **novembre 2006**, Paris, France, p 225-231

## Conférences internationales sans comité de lecture et/ou sans publication des actes

### *\*Conférencier (Speaker)*

29. J. FLOURY\*, A. DESRUMAUX & J. LEGRAND, Effect of ultra high pressure homogenization (350 MPa) on the texture of soy protein emulsions, 2002 IFT Annual Meeting and Food Expo, 15-19 **juin 2002** Anaheim, Californie (**conférence invitée**).
30. J. FLOURY, A. DESRUMAUX & J. LEGRAND, Modélisation de l'émulsification dans un homogénéisateur très hautes pressions, Congrès Mondial de l'Emulsion, 24-27 **septembre 2002**, Lyon, France (poster).
31. J. FLOURY, N. HAMARD, M.-N. MADEC, N. GROSSET, R. JEANTET\*, New prospects for non thermal stabilization of milk: use of pulsed electric fields, Innovation in dairy industry, 3-5 **November 2004**, Lugo, Spain (**conférence invitée**).
32. H. BOUAIQUINA, J. FLOURY, A. DESRUMAUX, J. LEGRAND\*, Effect of the process on the end-use properties of the emulsions. Congrès Mondial de l'Emulsion, 3-6 octobre 2006, Lyon, France (**conférence invitée**).
33. C. SALLES, S. BUCHIN, C. TRÉLÉA, J. FLOURY, P. SCHLICH, L. FOUCAT, P. COURCOUX, Reducing salt level in food: an integrated study of salt release and perception in model and real food systems. 1st IDF/INRA International Symposium on Minerals and Dairy Products. **October 1-3, 2008**, Saint-Malo, France (poster).
34. J. FLOURY\*, B. CAMIER, M.-H. FAMELART, Salt diffusion in model cheese systems with regards to their structure - texture relationships. 1st IDF/INRA International Symposium on Minerals and Dairy Products. **October 1-3, 2008**, Saint-Malo, France.
35. J. FLOURY\*, S. JEANSON, Colony distribution and solute diffusion in model cheese, First International Workshop on the IFR Gel Cassette, **May 18-19, 2009**, Paris, France.
36. S. ALY, J. FLOURY, S. LORTAL, S. JEANSON, Is diffusion of nisin in cheese model modified by differences in the matrix microstructure? IDF World Dairy Summit , United Dairy World 2009, **September 20-24, 2009**, Berlin, Germany (poster).
37. S. JEANSON\*, S. ALY, M.-N. MADEC, J. FLOURY, T. BROCKLEHURST, S. LORTAL. Microstructure of cheese matrix modifies solute migration at the bacterial colony scale: examples with nisin and lactic acid, IDF Symposium on Microstructure of Dairy Products, **June 9-11, 2010**, Tromsø, Norvège.
38. M.-H. FAMELART, M.-N. MADEC, S. JEANSON, S. LORTAL, J. FLOURY, Model cheese matrices: characterizing their micro- and macrostructure to study the migration of small solutes inside cheeses, Biopolymers' 2010: Food Matrices: Construction, destructuring, sensory and nutritional properties, **December 1-3, 2010**, Le Croisic, France (poster).
39. S. ALY, J. FLOURY, S. LORTAL, M.-N. MADEC, S. JEANSON, Is diffusion of nisin in cheese model modified by differences in the matrix composition? Biopolymers' 2010: Food Matrices: Construction, destructuring, sensory and nutritional properties, **December 1-3, 2010**, Le Croisic, France (poster).
40. J. FLOURY\*, M.-N. MADEC, S. JEANSON, S. ALY, S. LORTAL, Application of the FRAP technique to food matrices: migration properties of small solutes in model cheese. Biopolymers' 2010: Food Matrices: Construction, destructuring, sensory and nutritional properties, **December 1-3, 2010**, Le Croisic, France.
41. J. FLOURY\*, M.-N. MADEC, M.-H. FAMELART, S. JEANSON AND S. LORTAL, First assessment of diffusion coefficients in model cheese by Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) analysis. 2011 Joint Annual Meeting of the ADSA-ASAS, **July 10-14, 2011**, New Orleans, Louisiana, Etats-Unis.

42. S. LORTAL\*, V. GAGNAIRE, S. JEANSON, J. FLOURY, M.-N. MADEC, New approaches to understand cheese ripening. 2011 Joint Annual Meeting of the ADSA-ASAS, **July 10-14, 2011**, New Orleans, Louisiana, Etats-Unis.
43. P. DE SA PEIXOTO\*, M.-N. MADEC, J. FLOURY, A. BOUCHOUX, , G. GÉSAN-GUIZIOU, Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions through Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP): from the dilute to the highly concentrated/crowded regime, Colloids and Complex Fluids: Challenges and Opportunities – IFP Energies Nouvelles, **17 - 19 October, 2012**, Rueil-Malmaison, France.
44. P. DE SA PEIXOTO\*, J. FLOURY, A. BOUCHOUX, M.-N. MADEC, G. GÉSAN-GUIZIOU, Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions through Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP): from the dilute to the highly concentrated/crowded regime. The 6th International Symposium on Food Rheology and Structure - ISFRS 2012, **April 10 - 13, 2012**, Zurich, Suisse.
45. S. JEANSON, J. FLOURY, A. A. ISSULAH, M.-N. MADEC, J. CHADŒUF, V. GAGNAIRE, A. THIERRY\*, S. LORTAL, Exploration of the micro-environment around bacterial colonies in cheeses depending on their spatial distribution. 2012 IDF Cheese Ripening & Technology Symposium, **May 21 - 24, 2012**, Madison, USA.
46. V. GAGNAIRE\*, S. JEANSON, J. FLOURY, S. LORTAL, Peptides: a key fraction to control cheese ripening, 2012 IDF Cheese Ripening & Technology Symposium, **May 21 - 24, 2012**, Madison, USA.
47. J. VALLE COSTA SILVA\*, S. LORTAL, C. CAUTY, S. JEANSON, J. FLOURY, Diffusion of solutes and macromolecules in model cheese assessed by Fluorescence Recovery After Photobleaching, 2012 IDF Cheese Ripening & Technology Symposium, **May 21 - 24, 2012**, Madison, USA.
48. S. ALY, J. FLOURY; M. PIOT, S. LORTAL, S. JEANSON, The nisin efficacy in cheese cannot be predicted by its concentration, 2012 IDF Cheese Ripening & Technology Symposium, **May 21 - 24, 2012**, Madison, USA (poster).

## Chapitres d'ouvrage / Synthèses à vocation de diffusion et transfert

49. R. JEANTET, T. CROGUENNEC, P. SCHUCK & G. BRULE, Science des aliments, Vol 1. Stabilisation biologique et physico-chimique. Editions TEC & DOC Lavoisier, Paris, **2006** :
- Chapitre 10.1 : J. FLOURY & R. JEANTET, Opération de stabilisation biologique : réfrigération et congélation ;
  - Chapitre 10.4 : J. FLOURY, Opération de stabilisation biologique : Stabilisation par inhibition chimique ;
  - Chapitre 11 : J. FLOURY & C. CROGUENNEC, Opérations de stabilisation physico-chimique.
50. J. FLOURY & A. DESRUMAUX, Emulsions foisonnées : formulation et mise en œuvre, Formation inter-entreprises ARCHIMEX, 2004, Vannes.

## Thèse et mémoire diplômant

51. J. FLOURY, Experimental study of a membrane-based solvent extraction process and modelling of the mass transfer of volatile organic compounds, Rapport de DEA, INSA de Toulouse, **1999**, 48 p.
52. J. FLOURY, Structuration par homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions alimentaires, Thèse de Doctorat, Spécialité Génie des Procédés, Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes, **2002**, 271p.

## 2. GENESE DE L'ACTIVITE DE RECHERCHE ET ENVIRONNEMENT SCIENTIFIQUE

Mon activité de recherche a démarré en 1999 par un DEA, mené en parallèle de ma formation d'ingénieur biochimiste, à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Très attirée par le domaine de la physique appliquée, j'ai eu l'opportunité de me spécialiser en génie des procédés alimentaires au cours de ma dernière année de formation à l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon dans le cadre de l'Institut Supérieur d'Agro-Alimentaire (ISAA).

Ainsi, j'ai pu réaliser mon **stage de recherche de DEA (6 mois) dans le domaine du génie des procédés chez Unilever Research Vlaardingen (Pays-Bas)** sous l'encadrement d'A. Baudot et H. Smorenburg. L'objectif principal de ce projet de recherche était de modéliser le transfert de composés organiques volatiles (arômes) au sein d'un contacteur membranaire à fibres creuses à l'échelle pilote, en vue d'une extrapolation ultérieure à l'échelle industrielle. En effet, l'utilisation de membranes semblait être une excellente alternative pour l'extraction de composés aromatiques de produits alimentaires. Cette technique membranaire, qui s'apparente à l'extraction liquide-liquide, présente l'avantage de séparer physiquement le fluide alimentaire du solvant. En outre, l'utilisation d'un solvant organique tel qu'une simple huile végétale était envisageable pour extraire les composés lipophiles de solutions aqueuses, sans émulsification du produit avec le solvant, ni pollution de l'aliment par divers composés chimiques.

Nous avons retenu un modèle de résistances en série pour décrire les coefficients de transferts de matière globaux ( $K_o$ ) de différents composés d'arôme à travers la membrane, de la phase aqueuse vers le solvant. Ces résistances dépendent de la géométrie du système et du régime hydrodynamique. Nous avons vérifié expérimentalement que les résistances au transfert d'arômes dans les couches limites côtés solutions aqueuses (écoulement dans les fibres) et huile (écoulement à l'extérieur des fibres) pouvaient être déterminées par calcul à l'aide de corrélations semi-empiriques issues de la littérature. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence que la nature du composé d'arôme avait une grande importance sur l'efficacité du transfert, et donc sur les rendements d'extraction. **Ce travail a permis la rédaction de la publication N°2.**

Cette première expérience passionnante m'a fortement motivée pour continuer ma carrière dans le domaine de la recherche en réalisant une **thèse de fin 1999 à fin 2002**, toujours dans le domaine du génie des procédés alimentaires. Ce doctorat, **réalisé à Nantes au laboratoire de Génie des procédés - Environnement - Agroalimentaire (UMR CNRS ENITIAA-GEPEA) sous la direction de J. Legrand et de A. Desrumaux**, avait pour problématique l'étude de la structuration d'émulsions alimentaires par homogénéisation très hautes pressions. Le bilan des travaux de recherche menés dans ce cadre fait l'objet du chapitre 3.2.

En novembre 2002, j'ai été recrutée en tant que **Maître de Conférences** contractuelle en génie et technologie alimentaire sur le Pôle Agronomique de Rennes pour enseigner à l'ENSA et à l'INSFA, poste sur lequel j'ai été titularisée en 2004 suite au concours ayant eu lieu en juin 2003. Mon recrutement a eu lieu dans un contexte de projet de regroupement des équipes d'enseignement du département agroalimentaire de l'ENSA avec le Laboratoire de Recherche en Technologie Laitière de l'INRA (LRTL) en une Unité Mixte de Recherche INRA-ENSA. Ce regroupement permettait d'envisager de nombreuses opportunités de développement d'activités de recherche en génie des procédés appliqués soit au secteur laitier, soit à celui des ovoproduits.

Ainsi, depuis janvier 2004, les enseignants-chercheurs du département agroalimentaire réalisent officiellement leurs recherches au sein de **l'UMR INRA Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf (75**

permanents dont 37 chercheurs, enseignants-chercheurs et ingénieurs) dirigée par S. Lortal jusqu'à fin 2011, puis par J. Léonil depuis 2012. Cette UMR a pour mission, outre la production de connaissances fondamentales, de contribuer au développement de l'industrie laitière et des ovoproduits en leur permettant de mieux répondre aux exigences sociétales et qualitatives du marché.

Jusqu'en 2007, l'ensemble du personnel était réparti en 3 équipes disciplinaires : microbiologie, biochimie et physicochimie et génie des procédés et technologie alimentaire. J'ai fait partie de cette dernière équipe jusqu'à l'évaluation de l'UMR fin 2007, dont le domaine de recherche concernait essentiellement les procédés de stabilisation (champs électriques pulsés, hautes pressions dynamiques, traitements thermiques, concentration et séchage), tant du point de vue des aspects physiques et thermodynamiques que de leur impact sur les fonctionnalités des produits traités. Dans ce contexte, **j'ai développé entre 2003 et 2004, en collaboration avec R. Jeantet, un projet de recherche concernant la stabilisation de produits laitiers par Champs Electrique Pulsés.** Les principaux résultats obtenus, résumés en **annexe 2**, ont fait l'objet de **deux articles (N°8 et 9)** et d'une **communication orale (N°28)**.

Dès 2004, pour des questions de réorientations stratégiques des axes de recherche du département CEPIA de l'INRA, nous avons dû abandonner la thématique Champs Electriques Pulsés dans laquelle je m'investissais seulement depuis deux ans. La nouvelle directrice scientifique de l'UMR, J. Léonil, m'a alors confiée la mission de **développer une nouvelle thématique portant sur la « modélisation des transferts de matière en matrices laitières »** en m'impliquant activement dans le montage d'un **Programme de Recherche en Alimentation de l'INRA sur la réduction de la teneur en sel des aliments**. Outre le financement alloué par l'INRA, ce programme PRA Sel (2005-08) coordonné par C. Salles (INRA Dijon) a obtenu le soutien de la région Bourgogne et de UNILEVER R&D Vlaardingen. **J'ai donc pris la responsabilité des travaux menés par le Team 4 dans le cadre de ce projet PRA Sel.**

Ayant des compétences relativement limitées dans le domaine de la modélisation des transferts de matière en milieu complexe, **j'ai initié une collaboration avec les Pr. T. Pham (Université de Nouvelles Galles du Sud, Australie) et A. Le Bail (UMR CNRS GEPEA-ENITIAA).** Cette collaboration m'a permis de **partir en détachement à l'UNSW en Australie pour me former à la modélisation auprès de T. Pham pendant 10 mois, de septembre 2005 à juin 2006.** Nous avons développé un modèle mathématique permettant de simuler les transferts couplés d'eau et de sucre au cours du procédé de déshydratation osmotique de cubes de mangue. L'effet d'une congélation préalable du fruit sur les profils de gain en sucre et de perte en eau a également été pris en compte dans ce modèle, en intégrant l'évolution des caractéristiques microstructurales du tissu après congélation, observée en microscopie optique. **L'originalité de ce travail** résidait dans le fait que nous avons réussi à résoudre le système d'équations différentielles décrivant les transferts couplés de l'eau et du sucre avec la méthode des éléments finis dans une **géométrie 3D** grâce au logiciel de simulation numérique COMSOL Multiphysics™. Un bon accord quantitatif a été obtenu entre les simulations et les résultats expérimentaux du gain en sucre et de la perte en eau mesurés au cours de la déshydratation osmotique de tissus frais et congelés de mangue, à condition de choisir des valeurs correctes pour les paramètres décrivant les propriétés de structure des cellules (fractions volumiques des phases, facteur de tortuosité et perméabilité de la membrane des cellules au sucre et à l'eau). Les résultats de cette étude ont fait l'objet de la **publication n° 11.**

En parallèle de ce projet, T. Pham m'a proposé de **collaborer avec J. Carson (Université of Waikato, Nouvelle-Zélande),** sur un projet de simulation mathématique en 3D de la conductibilité thermique de matériaux composites (matériaux poreux ou fibreux) dont les résultats ont été valorisés dans la publication N°10. Cette collaboration entre T. Pham, le GEPEA (plus particulièrement avec O. Rouaud) et moi-même a ensuite été poursuivie pour **transférer les savoir-faire acquis en modélisation**

**aux produits de recherche du laboratoire STLO**, et en particulier à l'étude de la dynamique des solutés dans des matrices lipoprotéiques modèles dans le cadre du PRA sel.

Suite à l'évaluation de l'UMR STLO en 2007, les équipes du laboratoire ont été réorganisées de manière à améliorer leur lisibilité thématique. Ainsi, **il existe désormais six équipes de recherche** :

- Interactions structure - fonctionnalités des protéines et lipides (ISFPL)
- Biodiversité bactérienne et interactions in situ (B2ISI),
- Bioactivité et Nutrition (BN),
- **Dynamiques Réactionnelle et Diffusionnelle au sein des matrices laitières (D2R)**
- Transferts et interactions dans les procédés de l'industrie laitière (TIPIL),
- Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits (MICOV).

**Je fais partie depuis janvier 2008 de la nouvelle équipe D2R** qui s'intéresse principalement aux « **Dynamiques réactionnelles et diffusionnelles** » au sein des matrices laitières. Cette équipe a pour mission d'explorer, par une approche pluridisciplinaire, les mécanismes d'affinage *in situ* à l'échelle des colonies bactériennes. A cette fin, elle rassemble des compétences complémentaires : génie des procédés (J. Flourey, MC), biochimie-enzymologie (V. Gagnaire, CR1), physiologie *in situ* des bactéries lactiques (S. Jeanson, IE) et compréhension du fonctionnement des bactéries dans les matrices alimentaires (S. Lortal, DR1). Le pari d'une **mise en commun de ces compétences devait nous permettre d'avancer sur une question transversale : les interactions entre les colonies bactériennes et la matrice fromagère**. En effet, au cours de l'affinage des fromages, les microorganismes se développent sous forme de colonies immobilisées dans ces matrices « solides ». De par leur activité biologique, les colonies interagissent donc fortement avec la matrice environnante puisqu'elles doivent se développer en métabolisant des substrats présents dans la matrice (lactose, protéines, matière grasse), générant ainsi des produits de réactions enzymatiques : les métabolites (sucres, peptides, acides gras, composés d'arôme).

**Dans le cadre de cette thématique, les principales questions de recherche qui me préoccupent sont les suivantes : existe-t-il des limites diffusionnelles de substrats et/ou de métabolites à proximité des colonies microbiennes, et quels sont les facteurs clés impliqués (structure des fromages, caractéristiques des solutés) ?** Comme le montre la revue que nous avons publiée en 2010 (Publication N°14), il existe actuellement peu de données portant sur la migration de tels solutés dans la littérature. Mon objectif prioritaire est donc de modéliser la migration de ces solutés dans le fromage, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des solutés et de la microstructure des matrices fromagères, pour une meilleure maîtrise à terme de l'expression microbienne *in situ*.

## 3. MAITRISE DE LA QUALITE DES ALIMENTS, MATRICES MULTIPHASIQUES INSTABLES ET COMPLEXES

### 3.1. Contexte et problématique

L'aliment est un système complexe et hétérogène. Il est souvent constitué d'une matrice de nature protéique et/ou polysaccharidique imprégnée d'une phase continue généralement aqueuse, dans laquelle diffusent des solutés solubles hydrophiles de nature organique et minérale (glucides, sels, vitamines, etc.) et d'un certain nombre d'**éléments dispersés** : globules gras, bulles de gaz, tissus d'origine animale ou végétale, cellules microbiennes, cristaux, etc. Cette matrice est susceptible d'**évoluer d'un point de vue physicochimique** avec des conséquences sensorielles favorables ou défavorables :

- ✚ de par l'**instabilité thermodynamique** liée à son hétérogénéité, instabilité qui peut être accentuée par des contraintes de nature thermique et/ou mécanique
- ✚ de par les **activités biologiques internes** (enzymatique et/ou microbienne) souhaitées (affinage, maturation) ou indésirables (altération avec des conséquences sensorielles et sanitaires).

Les **éléments dispersés** sont soumis à des forces qui conduisent à des séparations de phase, soit par décantation lorsque la masse volumique des éléments dispersés est supérieure à celle de la phase dispersante, soit par crémage dans le cas inverse. Des gradients de potentiel chimique et de pression s'exerçant de part et d'autre des interfaces peuvent induire des transferts de solutés et des déstructurations (coalescence, plasmolyse). Cette instabilité physicochimique peut être accrue par des contraintes mécaniques et thermiques que subissent les produits au cours du stockage (réfrigération, congélation) et de leur mise en œuvre (décongélation, réchauffage, etc.).

Les **polymères** de nature **protéique et polysaccharidique**, qui contribuent pour une part importante à la structuration de l'aliment, sont susceptibles de se réorganiser au cours de la conservation compte tenu de l'influence de la température sur les interactions hydrophobes, ioniques et hydrogènes. On assiste parfois à des recristallisations qui s'accompagnent de libération et migration d'eau avec des modifications texturales (rétrogradation de l'amidon et rancissement du pain).

Les **agents biologiques**, enzymes et micro-organismes, trouvent dans la plupart des aliments des conditions favorables à leur action, tant au niveau des conditions physicochimiques (pH, aw, température) que de la disponibilité des substrats et facteurs de croissance. Les réactions de lipolyse, de protéolyse et d'oxydation, la production de métabolites (acides, alcools, gaz) et le développement de flores-positives ou pathogènes-sont autant d'éléments qui contribuent à **modifier la qualité organoleptique, hygiénique et nutritionnelle** des aliments. Il en est de même pour les réactions chimiques (réaction de Maillard, auto-oxydation des lipides).

### De l'empirisme à la technologie raisonnée

L'élaboration d'un certain nombre d'aliments qui constituent toujours la base de notre alimentation date de plusieurs siècles voire millénaires ; c'est le cas entre autres du pain, des fromages et du vin. Ces produits et tout particulièrement ceux issus de fermentations se sont développés sur la base d'observations empiriques, sans connaissances des matières premières et encore moins des phénomènes impliqués dans leurs transformations. Il a ainsi fallu attendre les travaux de Pasteur au XIXe siècle pour attribuer aux micro-organismes un rôle prépondérant dans l'évolution et la transformation des produits d'origine agricole.

Les transformations les plus anciennes (lait en fromage, céréales en pain ou bière, fruits en vin, muscles en charcuterie, etc.) reposent sur des phénomènes biologiques qui pouvaient se dérouler naturellement dans des conditions de teneur en eau et de température définies dans la mesure où les agents biologiques (enzymes et microorganismes) responsables des transformations ainsi que les substrats réactionnels et facteurs de croissance étaient présents dans les matières premières et/ou dans l'environnement immédiat ; il suffisait de laisser mûrir (lait, viande), d'écraser, de broyer et parfois d'hydrater (fruits, céréales) pour que les réactions biologiques puissent se dérouler ; c'est pourquoi ce type de produits a pu se développer sur la seule base d'observations de processus naturels.

Les connaissances acquises depuis la fin du XIXe siècle dans le domaine de la microbiologie et au début du XXe dans le domaine de l'enzymologie ont permis progressivement d'expliquer les phénomènes biologiques impliqués dans l'élaboration d'un certain nombre de produits alimentaires. Sur la base de ces connaissances, l'industrie alimentaire a cherché à maîtriser ces processus plutôt que de les subir, et c'est ainsi qu'est née une industrie de ferments puis des enzymes, qui produisent et commercialisent des agents biologiques adaptés à chaque type de transformation. Au cours des trente dernières années, de nombreuses équipes de recherche se sont consacrées à la science des aliments, ce qui a permis de mieux connaître la composition des diverses matières premières et d'élucider les mécanismes biologiques et physicochimiques impliqués dans l'élaboration de la texture, des saveurs et des arômes ; ces travaux ont permis à l'industrie alimentaire d'accéder à une meilleure identification des leviers déterminants dans la construction de la qualité, de sortir de l'empirisme et de raisonner la technologie.

Afin de **maîtriser les caractéristiques finales** (texture, flaveur, stabilité) et notamment la **microstructure des produits alimentaires formés**, il est primordial de **comprendre les interactions formulation / procédés de transformation / matrice**, afin de **mettre en évidence les facteurs limitants du système**.

Pour aller plus loin, **cette maîtrise de la qualité des matrices hétérogènes implique :**

- i. de **connaître la microstructure des produits**, d'où la nécessité de disposer de méthodes d'analyses structurales si possible non invasives,
- ii. **de bien appréhender les déterminants physicochimiques** (formulation) et **technologiques** (procédés) de la structure d'un aliment,
- iii. de pouvoir **caractériser les phénomènes d'instabilité physicochimique** ou **déterminer les limites diffusionnelles, stériques ou chimiques** (interactions avec les éléments dispersés) au déroulement de l'activité biologique en milieu hétérogène.

**Une approche pluridisciplinaire allant de la caractérisation physico-chimique à la modélisation des phénomènes de transformation mis en œuvre est donc indispensable.**

**Dans le cadre de mes activités de recherche, j'essaie d'appliquer cette approche à l'étude de deux systèmes d'aliments poly-phasiques : les émulsions et les fromages.**

Cette thématique de recherche s'insère parfaitement dans l'un des 3 nouveaux axes prioritaires du département CEPIA de l'INRA: « **Elaborer des aliments modèles et des modèles d'aliments prenant en compte la complexité** » (AMMAC).

## **Quelques notions sur la fabrication des émulsions**

Les émulsions sont des mélanges de liquides immiscibles dont une des phases est dispersée sous forme de gouttelettes dans la phase continue. On parlera d'émulsion huile-dans-eau si la phase lipidique est dispersée dans la phase aqueuse. Selon la formulation et le procédé d'émulsification utilisé, les émulsions peuvent présenter des textures extrêmement variées (liquide, crémeuse, gélifiée), ce qui les rend très attrayantes et explique leur développement dans des domaines aussi variés que la chimie (émulsion de



bitume, peinture), la pharmacie (pommades), la cosmétique (crèmes) ou l'agroalimentaire (sauces, produits laitiers...). La distribution de taille des éléments dispersés est la résultante de 2 phénomènes : le fractionnement des gouttelettes et la coalescence. Afin de retarder au maximum le phénomène de crémage des gouttelettes, on cherche à avoir un diamètre de gouttelettes le plus petit possible avec une distribution granulométrique peu dispersée. D'autre part, le fait de diminuer la taille des gouttelettes augmente théoriquement la viscosité de l'émulsion, ce qui a un effet texturant intéressant. Le fractionnement des gouttelettes nécessite de fournir une densité énergie très importante pour supplanter la pression de Laplace (pression qui se crée au niveau de l'interface, liée à l'immiscibilité des deux phases). Plus le diamètre des gouttelettes à rompre est petit, plus cette pression de Laplace, qui s'oppose au phénomène de fractionnement, est élevée (inversement proportionnelle au diamètre des gouttes). Les procédés d'émulsification sont donc souvent extrêmement cisailants. Cependant, cette énergie mécanique est quasiment intégralement dissipée sous forme de chaleur, ce qui limite en fait leur efficacité. Ces procédés mettent en jeu différents phénomènes mécaniques (turbulence, force d'élongation, cisaillement, cavitation...) qui permettent la formation d'émulsions plus ou moins fines, mais qui rendent la maîtrise des propriétés d'usage des produits extrêmement délicate.

**Dans ce mémoire, j'exposerai les outils expérimentaux et de modélisation que nous avons développés pour mieux comprendre les mécanismes de fractionnement/coalescence mis en œuvre au cours de l'émulsification dans un homogénéisateur pouvant monter à des pressions très élevées (350 MPa).**

## **Du lait au fromage**

Le lait est une émulsion naturelle, dont la phase dispersée est composée de globules de matière grasse et de micelles de caséine. Les micelles en suspension sont des particules sphériques dont le diamètre moyen est de l'ordre d'un dixième de micromètre ; ces particules sont constituées par l'association des caséines  $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  (des protéines) et de composants salins, essentiellement calcium et phosphate. La phase continue est une solution aqueuse de lactose, de protéines solubles (majoritairement  $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$ -lactoglobuline), de sels minéraux, et de nombreux autres solutés présents en faible concentration.

La fabrication du fromage comporte trois étapes : la coagulation qui aboutit à la formation d'un gel ; l'égouttage, pendant lequel une partie du lactosérum (phase aqueuse du lait) retenu par le gel est exsudée, et qui donne le caillé ; l'affinage, qui transforme le caillé et lui confère une texture plus souple et une flaveur plus marquée.

La coagulation du lait est obtenue par action de la présure, extraite de la caillette de veau, sur la caséine, plus précisément sur l'un des composants, la caséine  $\kappa$ . La présure contient une enzyme protéolytique, la chymosine ; dans son action coagulante, elle rompt une seule liaison de la longue molécule constituant la caséine  $\kappa$  ; un des deux fragments ainsi obtenus, de caractère acide et hydrophile, est libéré dans le lactosérum. L'autre fragment, de caractère basique et hydrophobe, reste intégré à la micelle. La perte du premier fragment diminue la charge des micelles et leur capacité de fixation d'eau : des liaisons entre les micelles s'établissent alors et le lait coagule. Il se forme un gel, état semi-solide au sein duquel le réseau protéique tridimensionnel emprisonne la phase aqueuse, la matière grasse du lait et les microorganismes.

Le gel ainsi formé est peu perméable, c'est pourquoi en fabrication fromagère traditionnelle, le gel doit être découpé avant moulage pour augmenter la surface d'échange et faciliter ainsi l'exsudation du lactosérum. C'est la phase d'égouttage. Celle-ci s'accompagne d'une acidification du caillé due à l'action des bactéries lactiques du levain introduit dans le lait au moment de l'emprésurage.

Le caillé obtenu est ensuite salé par saupoudrage de sel fin ou par immersion en saumure, et éventuellement ensemencé en surface selon le type de fromage fabriqué. La pâte est alors soumise à un affinage de plusieurs semaines à plusieurs mois à des températures variables, toujours selon le type de fabrication fromagère mis en œuvre. L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique : sous l'action d'enzymes, pour la plupart élaborées par la flore microbienne présente, les constituants du caillé sont dégradés. La pâte est ainsi modifiée dans son aspect, sa texture, sa consistance ; une saveur et un arôme nouveaux se développent.

Cette phase d'affinage, qui confère au fromage ses caractères typiques, est d'une grande complexité. La richesse et la diversité de la microflore, l'intervention d'une grande variété de systèmes enzymatiques sont à l'origine de plusieurs transformations biochimiques s'effectuant simultanément : fermentation du lactose, hydrolyse de la matière grasse, dégradation des protéines, et il se forme, au sein de la matrice, une gamme variée de produits nouveaux (Figure 1). Il s'agit donc d'une étape clé, spécifique à chaque variété de fromage, pour le développement de la saveur, de la texture et de l'aspect final du produit. La structure et la composition de la matrice fromagère varient tout au long du processus d'affinage, conduisant à l'élaboration des propriétés organoleptiques du produit fini. Enfin, chaque variété de fromages possède ses propres conditions d'affinage afin de développer des caractéristiques distinctes.

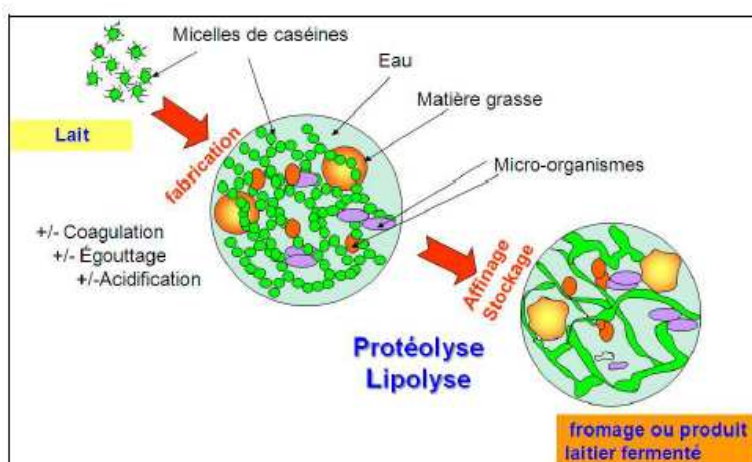


Figure 1. Représentation schématique de la structuration d'une matrice fromagère au cours du procédé de transformation (source : V. Gagnaire)

Les bactéries présentes dans la matrice fromagère, qu'elles soient issues de la population indigène du lait ou bien ajoutées lors de la fabrication, sont donc les principales actrices de l'affinage du fromage. Quelle que soit la technologie fromagère, les bactéries sont immobilisées dans la matrice laitière au cours de l'étape de coagulation et se développent donc sous forme de colonies. Les réactions biochimiques et enzymatiques survenant au cours de l'affinage du fromage sont catalysées par l'activité métabolique de ces colonies immobilisées et de leurs enzymes. La plupart des substrats (protéines, lipides, sucres, ...) vont devoir diffuser dans la matrice pour atteindre les colonies bactériennes, et les métabolites produits (peptides, acides aminés, acides gras,...) vont à leur tour diffuser des colonies bactériennes vers le réseau lipoprotéique. Des limitations de transfert de substrats et/ou de produits sont alors susceptibles de limiter la vitesse des réactions enzymatiques, la vitesse de croissance des bactéries immobilisées et/ou leurs activités métaboliques.

**L'enjeu de l'équipe D2R est d'atteindre une vision intégrée des phénomènes ayant lieu au cours de l'affinage à l'échelle de la colonie, et de mettre en relation les dynamiques d'expression du potentiel microbien avec les dynamiques réactionnelles et diffusionnelles au sein de la matrice fromagère.**

Avant d'aller plus loin, je souhaiterais d'abord **expliciter la notion de microstructure d'un aliment, dont la caractérisation représente un des verrous méthodologiques majeurs pour l'avancée de mes travaux de recherche.**

## **Les apparences macroscopiques de la microstructure des aliments**

La microstructure de l'aliment occupe une place centrale parce qu'elle représente le cœur du produit. Comme nous l'avons rappelé en introduction, un aliment est un système à composés multiples et à phases multiples. Il n'est ni homogène dans sa composition (= même concentration en composants partout), ni isotrope (= mêmes propriétés physiques dans toutes les directions). Cette hétérogénéité établit une structure qui est une propriété intrinsèque du produit alimentaire. Le terme **microstructure** au sens large **décrit l'organisation non-aléatoire des ingrédients et leurs assemblages qui définissent l'apparence macroscopique du produit, ses propriétés texturales et sensorielles.**

L'aptitude des ingrédients à réagir entre eux et à se lier à d'autres composants pour obtenir une structure plus complexe est la condition *sine qua non* pour une formation de microstructure. La plupart de ces processus restructurants sont contrôlés par les propriétés physicochimiques des ingrédients. **Nous discuterons dans le chapitre suivant de la dispersion par homogénéisation hautes pressions comme processus typique de structuration d'un aliment.** Nous verrons que le succès d'une dispersion dépend des processus mécaniques, hydrodynamiques et interfaciaux. En effet, au-delà de la formulation d'une émulsion, nous pouvons contrôler sa structuration d'une façon plus approfondie en contrôlant l'apport d'énergie au système, en concevant des conditions optimales d'écoulement et de cisaillement, ainsi qu'en utilisant des mécanismes de surface pour permettre la dispersion de la phase liquide dans la matrice continue.

La microstructure a une grande influence sur d'autres aspects de la qualité d'un produit, comme les perceptions d'arôme (hypothèse testée et validée dans le cadre du projet PRA sel), de couleurs ou bien les activités enzymatiques et chimiques. Ce dernier point constitue d'ailleurs l'hypothèse majeure de la problématique de l'équipe D2R, à savoir de **déterminer en quoi la microstructure de la matrice lipoprotéique conditionne l'activité métabolique des microorganismes, et donc l'activité catabolique de leurs enzymes, au cours de l'affinage des fromages ?**

Nos sens sont les premiers instruments permettant d'appréhender la microstructure d'un produit alimentaire. Elle se manifeste en effet dans le **comportement macroscopique du produit**. Nous pouvons trouver des **caractéristiques structurales sur différentes échelles de mesures** allant des nanomètres à l'échelle macroscopique des centimètres. Il est donc clair qu'**une seule méthode scientifique est insuffisante pour cerner le problème** (par exemple analyse microscopique ou spectroscopie mécanique).

*Ma première approche de la microstructure se fait généralement via l'étude de la texture par des méthodes physiques (rhéologie) qui permettent d'enquêter sur le comportement macroscopique du produit. La structure apparaît alors comme un indice donné indirectement par ces techniques. Ensuite, les techniques de microscopie couplées à l'analyse d'images me permettent d'enrichir notre connaissance sur la microstructure de la matrice.*

## 3.2. Structuration par homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions alimentaires

### 3.2.1. Contexte

Aujourd'hui, une double contrainte s'impose de plus en plus souvent aux industries alimentaires pour satisfaire le consommateur : assurer une parfaite salubrité des aliments d'une part tout en améliorant leur qualité nutritionnelle et sensorielle, en ayant notamment recours à des procédés efficaces mais moins sévères (notion de « minimal processing »). Des procédés physiques de conservation ou de transformation alternatifs (microfiltration, techniques ultra-propres, hautes pressions hydrostatiques, champs électriques pulsés, ultra-sons de haute intensité, etc.) ont été développés dans ce sens. En parallèle, les techniques de traitements thermiques (chauffage ohmique, UHT par injection de vapeur...) ont été optimisées afin de préserver les produits. Les effets de ces diverses technologies « émergentes » sur l'élimination ou l'inactivation de micro-organismes et d'enzymes, et sur les caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et nutritionnelles des principaux constituants alimentaires sont encore en cours d'étude. La mise en œuvre depuis 1997 de la Directive européenne « Novel Foods » nécessite en effet une connaissance approfondie des modifications que subissent les aliments soumis à toute technologie innovante.

C'est dans ce contexte que j'ai effectué ma thèse de 1999 à 2002 sur l'étude d'un nouveau procédé d'homogénéisation à très hautes pressions (jusqu'à 350 MPa) pour l'obtention d'émulsions très fines et/ou la modification des propriétés fonctionnelles de macromolécules (biopolymères, protéines).

**Ce travail de recherche avait pour objectif majeur de caractériser les différents mécanismes pouvant intervenir dans la valve de l'homogénéisateur sur le processus de dispersion des gouttelettes, en vue d'une meilleure maîtrise du procédé à l'échelle industrielle.**

Les procédés d'émulsification récemment développés cherchent à fractionner au maximum les gouttelettes de phase dispersée sous l'action d'un cisaillement intense. L'un des procédés les plus utilisés est l'homogénéisation à hautes pressions, dont le principe consiste à faire circuler à travers un espace étroit une émulsion grossière, afin de diminuer la taille des gouttelettes de la phase dispersée, et augmenter ainsi la durée de vie du produit, en limitant les phénomènes de déstabilisation (séparation et formation d'une couche de crème). Ce procédé d'homogénéisation a été largement étudié pour des pressions modérées allant jusqu'à quelques centaines de bars. La conception (1997), récente à l'époque de ma thèse, d'un homogénéisateur capable d'atteindre des pressions plus élevées (jusqu'à 350 MPa) semblait prometteuse. En effet, ce nouvel appareil devait permettre non seulement de former des émulsions très fines et donc plus stables, mais aussi de détruire la flore microbienne contenue dans les produits *in situ*, tout en préservant leurs qualités organoleptiques.

Le développement de ce nouveau procédé d'homogénéisation à très hautes pressions soulevait cependant de nombreuses questions qui nécessitaient des études plus approfondies. Ainsi, les mécanismes agissant dans la valve d'homogénéisation sur la rupture des gouttelettes, et l'effet des très hautes pressions sur la structure des produits formés, étaient très mal connus. L'étude bibliographique réalisée sur l'aspect "modélisation de l'écoulement" dans une valve d'homogénéisation, par des méthodes numériques (Kleinig et Middleberg 1996, 1997 et 1998; Stevenson et Chen 1997), a d'ailleurs souligné le manque de connaissance au sujet de l'impact de la dynamique de l'écoulement sur le processus d'émulsification. Cette synthèse bibliographique a aussi montré que le traitement dynamique haute pression offrait des potentialités intéressantes de modification des propriétés fonctionnelles des macromolécules émulsifiantes (protéines, polysaccharides).

Au-delà des propriétés habituellement mesurées (granulométrie, viscosité, stabilité), de nouvelles questions de recherche se sont donc posées : quels sont les mécanismes responsables du fractionnement des gouttelettes d'huile au cours du procédé d'homogénéisation à très hautes pressions ? Quel est l'impact des hautes pressions dynamiques sur la structure des protéines et leurs propriétés émulsifiantes, sur la texturation des produits alimentaires ?

### 3.2.2. Modélisation de l'écoulement dans la valve d'homogénéisation et processus de dispersion

#### Publications N°1-6-7

Afin de mieux cerner les processus responsables des propriétés granulométriques des émulsions obtenues par ce procédé, nous nous sommes attachés à caractériser l'hydrodynamique de l'écoulement dans la valve. Pour cela, l'idéal aurait été de pouvoir procéder à des mesures expérimentales des champs de vitesse et de pression. Cependant, du fait des faibles dimensions de la valve et des hautes pressions mises en œuvre, il s'est avéré impossible de placer les capteurs nécessaires à de telles mesures. Par conséquent, **l'étude de la structure de l'écoulement par une approche numérique** est une alternative intéressante qui a été développée.

*Pour cela, j'ai initié, dans le cadre de notre appartenance à l'UMR GEPEA, une collaboration étroite avec des spécialistes de mécanique des fluides, C. Solliec et J. Belletre, à l'Ecole des Mines de Nantes (EMN). J'ai également développé des outils expérimentaux originaux pour valider des phénomènes mis en évidence par les simulations numériques, comme la hauteur de l'entrefer en fonction de la pression appliquée, le phénomène de cavitation et la présence d'une zone de recirculation en sortie de valve. Sur ce dernier point, j'ai sollicité l'aide d'un des plus éminents spécialistes des émulsions alimentaires, P. Walstra, qui était encore à l'époque Professeur émérite à l'Université de Wageningen aux Pays-Bas. Celui-ci m'a reçu avec gentillesse pour m'aider à avancer dans la compréhension des mécanismes de dispersion mis en œuvre au cours de ce procédé d'émulsification. Ainsi, nous avons notamment mis au point une technique originale permettant de mettre en évidence un phénomène de recalescence immédiat des gouttelettes en sortie d'homogénéisateur, expliqué par le phénomène de recirculation du fluide observé lors des simulations numérique de l'écoulement dans la valve.*

Compte tenu des contraintes numériques fortes liées à la complexité de la configuration, et de l'absence de validation expérimentale, nous précisons que cette **étude est restée exploratoire**. De plus, cette étude numérique a été réalisée en condition d'écoulement stationnaire, sur un fluide monophasique tel que l'eau, considéré comme incompressible, en négligeant de surcroît les transferts thermiques dans l'installation. Cette démarche nous a néanmoins permis de mettre en évidence un certain nombre de phénomènes au niveau de la valve dont nous ignorions au départ la présence, comme par exemple la zone de recirculation en sortie d'entrefer, et ainsi de mieux comprendre les résultats surprenants que nous obtenions sur les émulsions aux plus fortes pressions d'homogénéisation. Cette étude numérique a également confirmé l'existence de fluctuations turbulentes et la présence de cavitation en aval de l'entrefer.

L'homogénéisateur utilisé dans le cadre de ce projet (Stansted Fluid Power Ltd, U.K) était une unité de laboratoire permettant l'homogénéisation à très hautes pressions d'échantillons de viscosité moyenne. L'homogénéisateur pouvait fonctionner jusqu'à des pressions de 350 MPa, dans une gamme de

volume variant 100 mL à quelques litres, et un débit volumique d'environ 10 L/h. Le principe de base est le mouvement du pointeau dans le siège de la valve (Figure 2). Le réglage de la contre-pression exercée sur la valve (jusqu'à 700 Pa) permet de diminuer l'entrefer  $h$  entre la valve et le siège. Le produit à homogénéiser arrive sur la valve à une pression très élevée, mais une vitesse relativement faible. Le passage à travers l'entrefer très étroit entre la valve et le siège provoque un accroissement très important de la vitesse du fluide. Celui-ci est alors soumis à d'importantes contraintes, qui provoquent le fractionnement des gouttelettes et donc l'homogénéisation du fluide. La pression en sortie de valve est la pression atmosphérique, et la vitesse du fluide redevient négligeable. Quasiment toute l'énergie fournie est convertie en chaleur, ce qui provoque un accroissement considérable de la température. Un échangeur thermique enveloppant le siège permet un refroidissement partiel de la valve par circulation d'eau à 5°C.

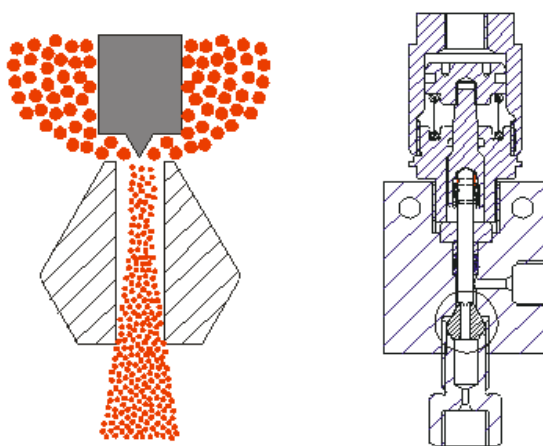


Figure 2. Schéma et principe de la valve de l'homogénéisateur hautes pressions, d'après STANSTED Fluid Power Ltd.

Les mécanismes de dispersion impliqués lors du processus de fractionnement des gouttelettes d'une émulsion diffèrent principalement selon le régime d'écoulement. Il était donc primordial de commencer par déterminer le régime d'écoulement dans toutes les zones de la valve de l'homogénéisateur. La première difficulté a été de connaître la hauteur d'entrefer de la valve en fonction de la pression appliquée. De par les très petites dimensions de la valve, et du fait que la valve constitue une enceinte "blindée" capable de résister à des pressions très élevées, la mise en place de capteurs de pression ou de vitesse était impossible au niveau de l'entrefer de cette valve d'homogénéisation hautes pressions. Nous avons donc utilisé des modèles issus de la littérature (Nakayama, 1964 ; Phipps, 1975), en les adaptant à la géométrie de la valve Stansted, pour estimer cette hauteur d'entrefer. Pour valider, au moins l'ordre de grandeur, de cette hauteur, j'ai également mis au point une expérience basée sur le passage de billes de cires déformables dans l'entrefer. En effet, sachant que le point de fusion de la cire se situe aux alentours de 50°C, l'idée était de passer une solution aqueuse contenant quelques billes de cire, ramollies à une température de 40°C, dans l'homogénéisateur hautes pressions. Ainsi, si les billes étaient suffisamment molles, elles se déformaient pour pouvoir passer dans l'entrefer (Figure 3). En mesurant ensuite les dimensions des particules obtenues au microscope optique, j'ai pu obtenir une estimation de la hauteur de l'entrefer à la pression d'homogénéisation appliquée lors du passage de la solution contenant les billes.

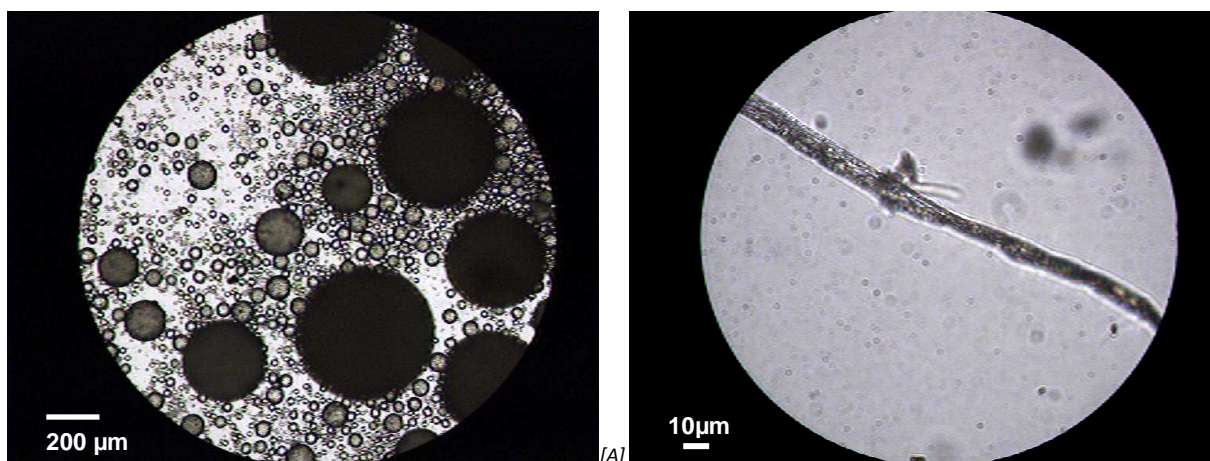


Figure 3. Vues microscopiques des billes de cire [A] avant et [B] après passage dans la valve à une pression de 10 MPa.

Nous en avons déduit une largeur moyenne d'entrefer de  $9,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$  pour une pression d'homogénéisation de 10 MPa, pour des hauteurs estimées de 7,6 et 7,75  $\mu\text{m}$  par les modèles de Nakayama (1964) et Phipps (1975). Nous en avons déduit que ces modèles nous permettaient d'obtenir une estimation valable de la hauteur de l'entrefer de la valve en fonction de la pression d'homogénéisation appliquée, comprise entre 2  $\mu\text{m}$  à la pression de 350 MPa et une dizaine de  $\mu\text{m}$  aux plus faibles pressions (< 10MPa).

Connaissant les autres dimensions exactes de la valve, nous avons pu estimer les valeurs du nombre de Reynolds en basant nos calculs sur un fluide tel que l'eau, supposé incompressible, mais en considérant la chute de viscosité liée à l'échauffement par dissipation visqueuse au cours de l'écoulement dans l'entrefer (environ 22°C par tranche de 100MPa). **Nous avons constaté que le régime d'écoulement était globalement laminaire dans l'entrefer (Publication N°6), contrairement à ce qui était stipulé dans la majorité des articles.**

Pour les simulations numériques de l'écoulement dans la valve d'homogénéisation réalisées grâce au logiciel Fluent® à l'EMN, notre choix s'est porté sur un modèle de turbulence plutôt que sur un modèle laminaire, bien que globalement le nombre de Reynolds dans la valve soit assez faible. En effet, compte tenu de la complexité de la géométrie de l'écoulement, l'apparition d'instabilités de nature turbulente en aval de l'entrefer semblait très probable, du fait de la forte accélération puis de l'expansion brutale du fluide à ce niveau. Nous avons tout d'abord, dans le cadre d'une étude de faisabilité, testé le modèle *k-ε standard* en raison de sa robustesse et de sa facilité de mise en œuvre. Cependant, celui-ci s'est avéré inadapté à la configuration étudiée : surestimation des vitesses et mise en défaut du modèle près des parois (non prise en compte des effets prépondérants de viscosité dans la sous-couche visqueuse et hypothèse d'une turbulence homogène et isotrope). Nous avons donc préféré réaliser les simulations numériques avec le **modèle RNG k-ε**, en intégrant un **traitement à bas nombres de Reynolds** dans la sous-couche visqueuse proche des parois, qui semblait mieux adapté à l'écoulement dans la valve d'homogénéisation que le modèle k-ε standard. Ce modèle est en effet reconnu pour ses meilleures performances dans le cas d'écoulements complexes (présentant des recirculations et/ou de fortes courbures, etc.) et en présence de parois.

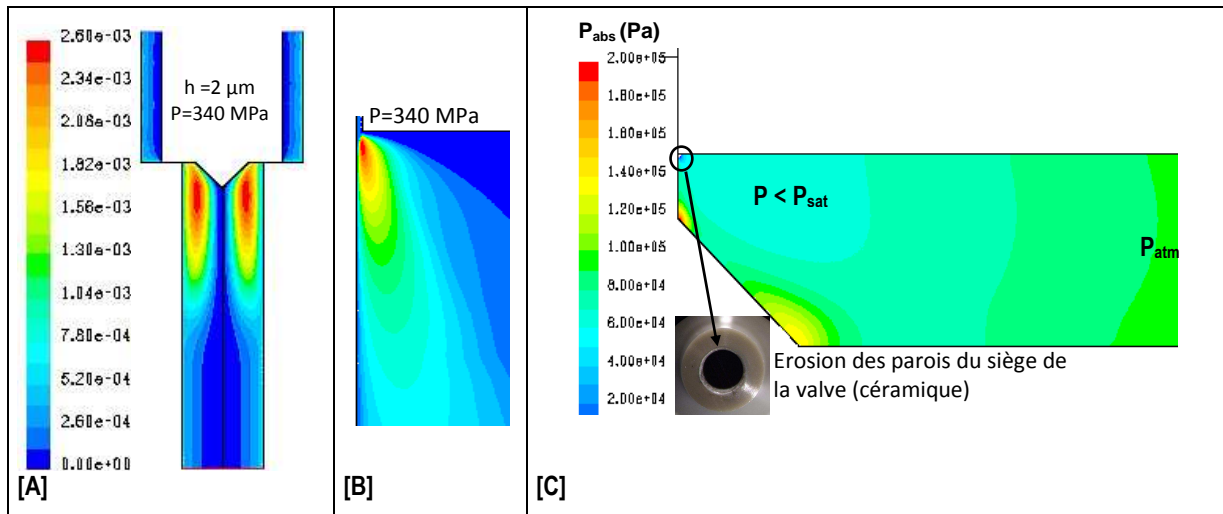


Figure 4. Résultats des simulations numériques [A] : fonctions de courant (kg/s) : zones de recirculation du fluide; [B] : contours d'intensité turbulente (%) au niveau de la sortie de l'entrefer; [C] : contours de pression (Pa) en aval de la valve et érosion des parois du siège de la valve par le phénomène de cavitation.

Sans détailler d'avantage la méthodologie pour arriver à simuler numériquement l'écoulement du fluide dans la valve de l'homogénéisateur Stansted, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de phénomènes hydrodynamiques (figure 4) qui permettaient d'expliquer les principaux mécanismes impliqués dans la dispersion des émulsions. Ceux-ci sont récapitulés sur le schéma de la figure 5 :

(1) tout d'abord les **forces de cisaillement élongationnelles** très élevées (de l'ordre de  $10^7 \text{ s}^{-1}$ ), générées par le **gradient de pression intense** (compris entre  $10^{11}$  et  $10^{13} \text{ Pa.m}^{-1}$ ) qui provoque l'**accélération** du fluide en amont de l'entrefer (de 0,21 à plus de  $100 \text{ m.s}^{-1}$ );

(2) puis le **passage de l'émulsion dans la lumière étroite de l'entrefer** (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ), où la largeur de l'écoulement est de l'ordre du diamètre de la goutte. Les résultats des simulations numériques ont montré une très forte accélération du fluide dans l'entrefer, qui peut atteindre des vitesses de l'ordre de  $200 \text{ m.s}^{-1}$  au niveau de la sortie de l'entrefer, pour des pressions de consigne de 340 MPa. Les profils de vitesse y sont paraboliques et les taux de cisaillement aux parois sont très importants (jusqu'à  $4.10^8 \text{ s}^{-1}$  à 350 MPa).

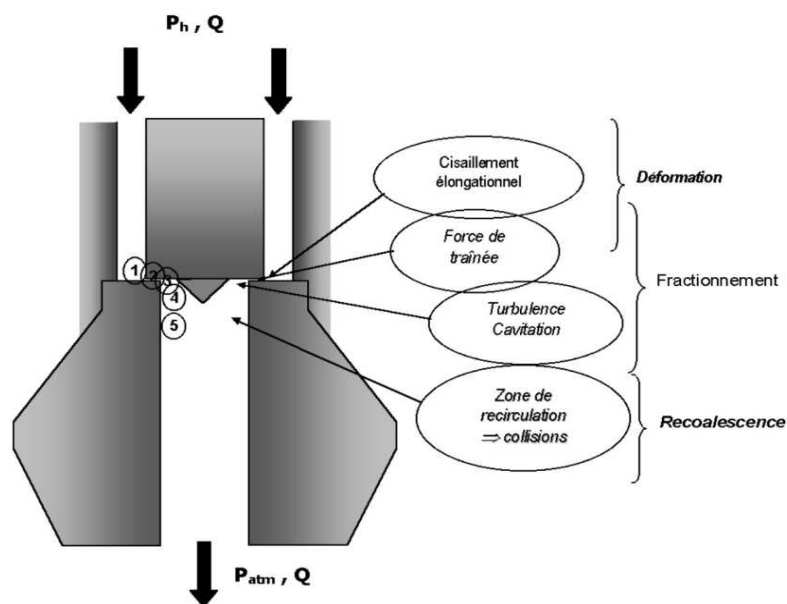


Figure 5. Schéma récapitulant les principaux mécanismes supposés responsables de la rupture des gouttelettes d'une émulsion dans la valve d'homogénéisation à très hautes pressions.



D'autre part, bien que le régime d'écoulement dans la valve d'homogénéisation soit globalement laminaire (faibles dimensions de la valve et débit peu élevé), les simulations numériques ont mis en évidence deux phénomènes importants qui sont fortement susceptibles d'intervenir comme **mécanismes supplémentaires sur le fractionnement** des gouttelettes d'huile. Ainsi, nous avons pu visualiser grâce aux résultats numériques :

**(3) une zone de turbulence** juste en aval de l'entrefer, dont l'intensité devient très importante (> 25%) aux pressions d'homogénéisation supérieures à 200 MPa. Les fluctuations turbulentes sont générées par le cisaillement entre les deux écoulements de vitesses différentes : « jet noyé » très rapide issu de l'entrefer (de l'ordre de  $100 \text{ m.s}^{-1}$ ) dans l'écoulement local très lent (de l'ordre du  $\text{m.s}^{-1}$ ).

**4) le développement d'une zone de cavitation** au niveau de l'élargissement brusque, provoquée par la chute de pression dans la zone de mélange créée par le jet issu de l'entrefer.

**Ces simulations numériques étant basées sur un certain nombre d'hypothèses, il nous est apparu important de confirmer expérimentalement la présence de ce phénomène de cavitation.** Pour cela, j'ai adapté une technique récente à l'époque, mise au point par Kumar et Pandit en 1999, basée sur une réaction chimique ayant lieu uniquement en présence du phénomène de cavitation : l'oxydation du iodure de potassium (KI) en iode ( $\text{I}_2$ ) par des radicaux libres  $\dot{\text{O}}\text{H}$  très fortement oxydants et résultats du phénomène de cavitation.

La présence d'iode peut être ensuite facilement détectée en ajoutant dans la solution à homogénéiser de l'amidon natif de pomme de terre, car l'amylose forme en présence d'iode un complexe bleu foncé. Les résultats expérimentaux ont confirmé l'existence de ce phénomène de cavitation, dont l'intensité augmente d'ailleurs fortement avec la pression d'homogénéisation appliquée. Bien que la cavitation puisse contribuer à augmenter l'efficacité du fractionnement des gouttelettes d'une émulsion, nous avons pu constater qu'il entraînait une **érosion importante** du siège de la valve.

Enfin, l'analyse de la structure de l'écoulement nous a permis de mettre en évidence la présence d'une large **zone de recirculation** en sortie de valve **(5)**, due au phénomène de décollement du fluide au niveau de l'expansion brusque en sortie d'entrefer.

Cette zone de recirculation est défavorable aux phénomènes de fractionnement et au contraire peut générer de la recalescence de gouttelette si l'émulsifiant n'a pas encore eu le temps de migrer aux nouvelles interfaces formées. Ceci doit particulièrement être le cas si l'émulsifiant est une macromolécule (protéine ou polysaccharide) car sa cinétique d'adsorption est lente par rapport à un tensioactif de faible masse moléculaire.

**C'est pourquoi j'ai développé, avec l'aide de P. Walstra, une méthode expérimentale permettant d'évaluer l'intensité du phénomène de recalescence immédiat des gouttelettes (tout juste fractionnées), inspirée des travaux de Taisne et al. (1997).** Cette méthode reposait sur des mesures de transfert d'huile pouvant avoir lieu entre les gouttes d'émulsions huile-dans-eau au cours de l'émulsification. Ainsi, le taux de recalescence pendant l'homogénéisation pouvait être déterminé en évaluant les changements de composition des gouttelettes par mesure de l'évolution de la turbidité d'un mélange de deux émulsions préparées à partir de deux huiles d'indice de réfraction différent.

Ces mesures ont révélé que le taux de recalescence augmentait avec la pression d'homogénéisation appliquée. Nous avons pu relier la valeur de ces taux de recalescence aux largeurs des distributions granulométriques des émulsions obtenues. L'efficacité du processus de fractionnement était fortement limité à partir de 200 MPa, du fait de la forte probabilité de collision dans la zone de recirculation des gouttelettes tout juste fractionnées, qui n'étaient donc pas encore suffisamment bien protégées par une couche d'émulsifiants adsorbés.

**Le processus d'émulsification global pourrait donc être optimisé en limitant l'étendue de la recalescence de deux façons : (i) soit par modification de l'écoulement en aval de l'entrefer de la valve, pour réduire le nombre de collisions entre gouttes tout juste fragmentées, (ii) soit par changement de la nature de la monocouche de tensioactifs afin d'obtenir une meilleure protection contre la coalescence.**

En effet, il ressort des résultats de cette étude du phénomène de coalescence en sortie de valve que l'énergie intense générée par l'application de pressions d'homogénéisation très élevées n'est pas utilisée de manière optimale lors de la fabrication d'émulsion : d'un côté, cette énergie très élevée permet un fractionnement très efficace des gouttelettes d'huile, mais en contrepartie, la géométrie de la valve d'homogénéisation génère un écoulement recirculant dans la conduite de sortie de la valve, qui entraîne une recalescence non négligeable de ces gouttelettes nouvellement formées.

### **3.2.3. Structuration des émulsions**

#### **Publications N°3-4-5**

Les émulsions alimentaires faisant intervenir un certain nombre de constituants (hydrocolloïdes, protéines), l'étude de l'hydrodynamique de l'écoulement dans l'homogénéisateur ne suffit pas à expliquer les caractéristiques des émulsions obtenues. En effet, comme nous venons de le voir, le procédé d'homogénéisation combine un traitement mécanique intense à un temps de séjour très court. Un tel traitement, couplé à une élévation conséquente de la température par dissipation visqueuse (environ 20°C/100MPa), peuvent donc modifier les propriétés des constituants alimentaires. Des études publiées par l'équipe de Paquin au Canada quasiment au moment du démarrage de ma thèse (1997-98) avaient déjà montré un effet non négligeable de l'homogénéisation hautes pressions (jusqu'à 150 MPa) sur des protéines et des polysaccharides. **Ceci nous laissait penser qu'en plus de diminuer la taille des globules gras d'une émulsion, ce procédé d'homogénéisation à très hautes pressions pouvait être un outil pour créer des molécules à fonctionnalité dirigée.**

#### ***Hautes pressions dynamiques et propriétés physicochimiques des macromolécules émulsifiantes***

Les contraintes mécaniques générées par le traitement d'homogénéisation hautes pressions sont telles que le procédé peut non seulement agir sur la structure des émulsions, mais également sur les propriétés des composés macromoléculaires émulsifiants. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au comportement de deux macromolécules présentant des propriétés émulsifiantes de par leur caractère amphiphile : un polysaccharide, la méthylcellulose et une protéine globulaire, la globuline 11S du soja.

***L'étude de ces systèmes a été possible grâce à une collaboration étroite avec le laboratoire BIA de l'INRA de Nantes. L'étude sur la méthylcellulose a été réalisée en partenariat avec M. Axelos (INRA de Nantes), tandis que l'étude sur la globuline du soja a été menée en collaboration avec Y. Popineau et S. Bérot.***

La méthylcellulose est une molécule neutre, largement utilisée dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique pour ses propriétés thermo-gélifiante (transition sol/gel vers 60°C) et tensioactive (additif E461). Les protéines de soja sont quant à elles souvent employées dans l'industrie alimentaire pour leurs nombreuses propriétés fonctionnelles (émulsifiantes, moussantes, gélifiantes et épaississantes). Néanmoins, malgré leur importance commerciale, il existe encore peu de données sur les propriétés émulsifiantes de ces protéines.

Pour mener cette étude, j'ai choisi d'utiliser la stratégie suivante : étudier l'effet du procédé d'homogénéisation hautes pressions sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la méthylcellulose ou des protéines de soja en solution aqueuse. En parallèle, afin de pouvoir découpler les effets pression, température et cisaillement ayant lieu simultanément dans la valve d'homogénéisation, j'ai appliqué trois traitements différents aux solutions de méthylcellulose ou de protéines de soja de manière indépendante:

- traitement haute pression statique,
- traitement thermique,
- cisaillement continu dans une cellule développée à l'ENITIAA par C. Loisel.

De par ma formation d'Ingénieur biochimiste de l'INSA de Toulouse, j'avais toutes les compétences nécessaires pour caractériser l'impact de l'ensemble de ces traitements sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles des macromolécules étudiées. De plus, je disposais d'un environnement analytique riche sur le site de la Géraudière à Nantes, entre l'ENITIAA et le laboratoire BIA de l'INRA. En particulier, j'ai pu caractériser l'évolution des propriétés d'adsorption des protéines ou du polysaccharide en fonction de l'intensité du traitement dynamique hautes pressions appliqué grâce au tensiomètre à goutte (Tracker, IT Concept, France) disponible à l'INRA. Cet appareil m'a permis de mesurer les cinétiques d'adsorption des molécules émulsifiantes par mesure de l'évolution temporelle de la tension interfaciale entre la goutte d'huile et la phase aqueuse, et de caractériser le comportement viscoélastique des interfaces formées par des mesures en mode oscillant. J'ai modélisé les cinétiques d'adsorption par un modèle décrivant un phénomène de diffusion pure (Serrien et Joos, 1990) pour obtenir les temps caractéristiques d'adsorption des différentes molécules émulsifiantes à l'interface (en mode statique).

## Résultats majeurs

La chromatographie d'exclusion stérique a montré, pour la méthylcellulose, une diminution importante de la masse moléculaire moyenne du polymère lorsque l'intensité du traitement dynamique hautes pressions augmentait. La chute de la masse moléculaire moyenne de la méthylcellulose a été associée à la rupture de liaisons covalentes intra-moléculaires de type glycosidique. De plus, des études par RMN du <sup>13</sup>C (réalisées par le CERMAV de Grenoble) ont montré que les substitutions méthyles greffées sur la chaîne polymérique (responsables des propriétés hydrophobes de la molécule) étaient préservées. En parallèle, des modifications importantes des propriétés émulsifiantes ont été constatées : augmentation de la vitesse de diffusion du polymère à l'interface huile/eau et diminution de la viscoélasticité de l'interface.

**Les résultats obtenus avec les émulsions stabilisées par les globulines 11S de soja se sont avérés très différents de ceux obtenus avec la méthylcellulose.** Ainsi, nous avons observé que, par effet simultané des hautes pressions et de la forte hausse de température dans la valve (22°C/100MPa), un traitement dynamique à une pression supérieure à 200 MPa induisait une polycondensation intense des globulines 11S. Par analogie avec un traitement par haute pression statique ou par un traitement thermique classique, nous avons supposé qu'il y avait tout d'abord désagrégation des assemblages polypeptidiques, puis "dépliage" de la structure tertiaire de la protéine. Ce déploiement des protéines modifie les interactions au niveau des chaînes latérales d'acides aminés et entre ces chaînes et le solvant. Les parties hydrophobes sont ainsi en contact avec le milieu aqueux environnant et favorisent l'agrégation des protéines.

Nous avons constaté que les propriétés émulsifiantes des globulines de soja dépendaient également de l'intensité du traitement dynamique haute pression subi. Si le traitement appliqué était de

l'ordre de 150 MPa, les protéines 11S s'adsorbaient alors plus rapidement à l'interface par rapport à la protéine native, vraisemblablement par une exposition des parties hydrophobes de la molécule permettant l'augmentation de ces propriétés tensioactives. En revanche, lorsque la pression d'homogénéisation appliquée était plus élevée ( $> 150$  MPa), la forte agrégation des protéines rendait le mécanisme d'adsorption à l'interface beaucoup plus lent. D'autre part, comme dans le cas de la méthylcellulose, nous avons montré que le traitement dynamique haute pression avait pour effet de diminuer la viscoélasticité de l'interface stabilisée par des globulines 11S traitées par rapport à celle stabilisée par des molécules à l'état natif.

### ***Microstructure et stabilité des émulsions obtenues par HPH***

Concernant la structure des émulsions stabilisées par la méthylcellulose, l'homogénéisation hautes pressions jusqu'à 150 MPa a permis d'obtenir de très faibles diamètres de gouttelettes d'huile ( $d_{32} \approx 0,5$   $\mu\text{m}$ ). Contrairement à ce qu'on attendait, cette réduction de la taille des gouttelettes s'accompagnait d'une forte diminution de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant des émulsions. Ce phénomène a été relié à la dégradation intense du polymère, qui présente alors une plus faible viscosité en solution aqueuse (phase continue). Quand la pression d'homogénéisation dépassait 150 MPa, cette structuration des émulsions était fortement perturbée par l'échauffement important du fluide dans la valve ( $> 60^\circ\text{C}$ ). L'augmentation de la température provoquait alors un changement de phase sol-gel de la méthylcellulose, et par conséquent, la perte de ses propriétés tensioactives: les gouttelettes nouvellement formées coalesçaient immédiatement après leur passage dans la valve.

Dans le cas des émulsions stabilisées par les protéines 11S de soja, l'augmentation de l'intensité de la pression d'homogénéisation permettait de diminuer le diamètre moyen des gouttelettes ( $d_{32}$ ), qui atteignait moins de 0,3  $\mu\text{m}$  à la pression maximale de 350 MPa. En accord avec Kiefer (1977), nous avons pu établir que cette réduction de la taille des gouttelettes était proportionnelle à la hauteur de l'entrefer. Néanmoins, nous avons aussi constaté une « ré-augmentation » de la largeur de la dispersion et du diamètre moyen en volume ( $d_{43}$ ) à partir de 200 MPa.

Contrairement aux émulsions à base de méthylcellulose, la viscosité et le caractère rhéofluidifiant des émulsions stabilisées par les globulines 11S de soja augmentaient très fortement avec la pression d'homogénéisation, du fait d'un important phénomène de floculation par pontage des gouttelettes. Lorsque la pression dépassait 200 MPa, nous avons observé une structuration très importante du produit obtenu, avec formation d'une texture "gélifiée". La floculation est principalement causée par la dénaturation des protéines émulsifiantes lors du traitement dynamique hautes pressions, qui favorise l'apparition d'interactions intermoléculaires entre les molécules adsorbées sur des gouttelettes voisines d'émulsions.

Cette "structuration" du produit était particulièrement intéressante dans la mesure où elle permettait de générer des textures d'émulsion pouvant répondre à certaines attentes de consommateurs. D'autre part, cette gélification permettait de prévenir de manière très efficace le phénomène de crémage des gouttelettes.

### 3.2.4. Conclusion et retombées

Cette étude de la structuration d'émulsions par homogénéisation à très hautes pressions a montré qu'il semble exister un **"optimum" de pression opératoire, situé entre 150 et 200 MPa**, pour lequel les diamètres moyens des gouttelettes sont minimaux et les largeurs des distributions granulométriques des émulsions les plus homogènes. **L'homogénéisation hautes pressions ( $P < 200$  MPa) a permis en tout cas de produire des émulsions très stables, puisque les diamètres moyens étaient très inférieurs au micromètre. De plus, les textures générées étaient intéressantes, bien que très différentes selon la nature de l'émulsifiant choisi (fluidification ou "gélification").**

Pourquoi parler d'un "optimum de pression opératoire"? Lorsque la pression d'homogénéisation appliquée dépassait 150-200 MPa, l'apport d'énergie mécanique supplémentaire a permis une dispersion très efficace du système émulsionné, par un fractionnement intense des gouttelettes. Néanmoins, il est apparu qu'un tel apport énergétique pouvait aussi "ruiner" la capacité de l'ingrédient à agir comme élément structurant (comme dans le cas de la méthylcellulose). De plus, la géométrie de la valve d'homogénéisation générait un écoulement recirculant en aval de l'entrefer, qui entraînait une recoalescence importante des gouttelettes nouvellement formées.

**A la suite de ce travail de thèse, de nouvelles questions de recherche ont été soulevées.** Par exemple, comment intégrer la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, loin d'être négligeable aux pressions élevées, aux simulations numériques de l'écoulement dans la valve d'homogénéisation? De plus, la validation expérimentale des champs de vitesse et de pression obtenus de manière numérique étant impossible, cette résolution couplée des équations de conservation avec l'équation de la chaleur permettrait de tester le modèle numérique sur des profils de température, qui me semblent plus faciles à obtenir expérimentalement. Il aurait aussi été intéressant de réaliser ces simulations numériques en intégrant les propriétés rhéologiques de fluides plus complexes, se rapprochant davantage d'une émulsion huile-dans-eau (en considérant par exemple l'émulsion comme un pseudo-fluide homogène de comportement rhéofluidifiant).

**En ce qui concerne la valorisation de ce travail de thèse à l'échelle industrielle, ce nouveau procédé d'homogénéisation à très hautes pressions présentait en 2002 des potentialités d'applications industrielles très prometteuses, notamment dans le domaine laitier.** Nous avons ainsi réalisé à plusieurs reprises au cours de ma thèse des essais d'homogénéisation à très hautes pressions de bases fromagères et de lactosérum avec le groupe Bel.

**Ce travail de thèse a aussi débouché sur des collaborations étroites entre le laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire, des laboratoires de recherche français et différents industriels.** En effet, ce « nouveau » procédé d'homogénéisation offrant de nombreuses potentialités de création de textures nouvelles ou de modification des propriétés fonctionnelles des macromolécules, **un programme RARE « Stabilité des émulsions, suspensions et systèmes colloïdaux foisonnés » (2002-2005)** a été monté avec une dizaine de laboratoires français (porteur du projet INRA de Nantes) et six industriels (Lactalis, Danone, Degussa, Ingredia, Rhodia, ITConcept). Dans ce cadre, A. Desrumaux, qui coordonnait l'aspect « procédé » du projet, a poursuivi mon projet de recherche par la **thèse de H. Bouaouina entre 2002 et 2005**, intitulée « Contribution à l'étude de l'homogénéisation hautes pressions, applications à des bases laitières complexes ».

Enfin, ce procédé d'homogénéisation à très hautes pressions permettait d'envisager la débactérisation de fluides alimentaires en continu, en considérant qu'il s'agit d'un procédé "combiné" associant une pressurisation-dépressurisation quasi-instantanée à un cisaillement, de la cavitation et un échauffement modéré ( $< 50-60^{\circ}\text{C}$ ). Dans cette optique, **un programme de recherche interministériel AQS**

**(Aliment Qualité Sécurité, 2002-2005) a donc été monté par A. Desrumaux avec l'Université de Montpellier II (E. Dumay et J.C. Cheftel) et les industriels Lactalis et Ingredia suite à ma thèse. Ce programme AQS avait pour objectif d'étudier les possibilités de ce nouveau procédé sur l'inactivation de la flore microbienne et des enzymes du lait, ainsi que son effet éventuel sur les propriétés technofonctionnelles des protéines contenues dans le lait.**

**D'un point de vue personnel, cette thèse m'a permis de rédiger 6 articles dans des revues internationales et participer au travers de 3 communications dans des congrès internationaux (dont une conférence invitée). J'ai également obtenu le prix du meilleur CV au congrès de la SFGP de Nancy en 2001 et le prix de thèse Marcel Loncin lors des rencontres AGORAL à Nantes en 2004.**

L'expertise acquise dans le domaine des procédés d'émulsification m'a permis de rédiger avec mon collègue T. Croguennec le chapitre sur la « stabilisation des systèmes dispersés » dans l'ouvrage « Science des Aliments » vol. 1, coordonné par R. Jeantet, T. Croguennec, P. Schuck et G.Brulé. Cet ouvrage a obtenu le prix Roberval en 2008, et constitue une référence dans le domaine de la Science des Aliments pour de nombreux enseignants de cette discipline. Enfin, je dispense plusieurs cours sur la stabilisation des systèmes dispersés, ainsi que sur les procédés de mélange-agitation, aux étudiants d'AGROCAMPUS OUEST ou de l'Université Rennes 1 dans le cadre du Master ALIMM.

## 3.3. Dynamique des solutés et structure des matrices

### 3.3.1. Contexte

Cette thématique est relativement nouvelle au STLO (2005), et concerne la compréhension des phénomènes de transfert de matière impliqués dans le salage et l'affinage des fromages, ou lors de la consommation des produits. Comme nous l'avons déjà évoqué en introduction, une matrice laitière est un système multiphasique, constitué d'un réseau de nature protéique, d'une phase soluble continue et d'éléments dispersés. Les espèces dissoutes de la phase soluble ont des propriétés de diffusion dépendantes de leurs caractéristiques physico-chimiques, et sont en équilibre entre la phase solvante et les éléments dispersés. Les caractéristiques physico-chimiques et de structure de la matrice ont également un rôle déterminant sur le transfert des solutés (selon leurs masses, charges et propriétés hydrophiles). La dynamique des solutés dans les matrices fromagères a un rôle essentiel dans le déroulement des réactions biologiques au sein de l'aliment (affinage, maturation), lors des étapes technologiques de stabilisation et/ou de formulation (séchage, incorporation de conservateurs ou d'agents de texture) et dans l'expression des qualités organoleptiques du produit obtenu. Elle est modifiée par la création de gradients (concentration, pH, pression partielle, etc.), qu'ils soient d'origine technologique, biologique et/ou physico-chimique.

**Malgré l'intérêt que l'on peut porter à ces questions, nous avons mis en évidence dans une revue bibliographique publiée en 2010 (publication N°14) que relativement peu de données scientifiques sont aujourd'hui disponibles dans le cas des matrices laitières et fromagères.** Cette revue bibliographique avait deux objectifs principaux : (i) faire le bilan des valeurs publiées des coefficients de diffusion de différents solutés dans les fromages et (ii) passer en revue les méthodes expérimentales disponibles pour déterminer les propriétés de transfert de solutés dans des milieux complexes comme le fromage, en considérant également des méthodes alternatives potentiellement applicables aux fromages. Ainsi, les quelques études publiées concernaient majoritairement le transfert du sel pendant les phases de salage et d'affinage de différents fromages à pâtes molles ou à pâtes dures. Très peu d'études concernant les propriétés de transfert d'autres solutés dans les fromages avaient été publiées. Dans la plupart des études, les coefficients de diffusion avaient été obtenus par la méthode dite «des profils de concentration», méthode macroscopique très lourde et destructive. D'autres techniques, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la redistribution de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP), ont été utilisées dans le domaine médical pour mesurer des propriétés de transfert *in situ*. Cependant, elles n'ont encore été que très peu (RMN) ou pas été appliquées à des matrices complexes comme le fromage.

**Nous en avons déduit que les perspectives en matière de recherche dans ce domaine seraient principalement de (i) développer de nouvelles techniques expérimentales pour modéliser à l'échelle microscopique les propriétés de transfert de solutés dans des milieux complexes comme le fromage ; (ii) de déterminer des propriétés de transfert des métabolites impliqués dans les réactions enzymatiques pendant l'affinage du fromage.**

### 3.3.2. Bases théoriques de la diffusion

Dans un solide, la répartition non homogène de l'eau ou de toute autre molécule dans l'espace provoque un gradient de concentration à l'origine d'un transport de matière par diffusion. Celui-ci est caractérisé par une « marche au hasard » des molécules depuis les régions de forte concentration vers les régions de faible concentration. Le carré de la distance parcourue est en moyenne proportionnel au temps nécessaire. La première loi de Fick exprime que, dans un milieu isotrope, immobile et à volume constant, la quantité de matière diffusante qui traverse l'unité de surface par unité de temps dans la direction considérée est proportionnelle au gradient de la grandeur diffusante. Le facteur de proportionnalité est appelé coefficient de diffusion  $D$  ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ). Dans le cas d'une diffusion unidirectionnelle en régime permanent, lorsque le coefficient de diffusion est constant et que le mouvement d'ensemble du milieu est faible, la 1ère loi de Fick s'écrit (Crank, 1975):

$$F = -D \frac{dC}{dx} \quad (1)$$

où  $F$  est le flux de matière du soluté diffusant ( $\text{kg}$  ou  $\text{mol}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ),  $C$  est la concentration du soluté ( $\text{kg}$  ou  $\text{mol}.\text{m}^{-3}$ ) et  $x$  est la distance parcourue par le soluté ( $\text{m}$ ).

La migration peut être induite par la présence d'un gradient de potentiel (concentration, potentiel chimique) préexistant dans le milieu (stockage) ou provoqué par un procédé de transformation.

#### Migration en milieu liquide

Dans les solutions diluées, lorsque le soluté a un volume moléculaire important, environ cinq fois plus élevé que celui du solvant, son coefficient de diffusion  $D$  est inversement proportionnel à la viscosité de la solution. Il est déterminé à partir de la relation de Stokes – Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu R_h} \quad (2)$$

où  $k_B$ ,  $T$ ,  $\mu$  et  $R_h$  sont respectivement la constante de Boltzmann ( $\text{J}.\text{mole}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ), la température ( $\text{K}$ ), la viscosité de la solution ( $\text{Pa}.\text{s}$ ) et le rayon du soluté ( $\text{m}$ ).

Dans cette théorie, on considère l'eau comme un continuum dans lequel se déplacent des sphères de solutés.

#### Migration dans les matrices laitières

**La modélisation des phénomènes de transport de solutés à travers une matrice hétérogène est compliquée.** L'équation de Stokes-Einstein n'est pas adaptée pour prédire des propriétés de diffusion dans des aliments (Varzakas et al., 2005). Dans le cas du fromage, les solutés doivent diffuser dans la phase aqueuse contenue à l'intérieur de la matrice poreuse formée par le réseau lipoprotéique. Néanmoins, si on fait l'hypothèse qu'à l'échelle spatio-temporelle d'observation, la matrice peut être considérée comme isotrope, immobile et de volume constant, alors les conditions de Fick sont vérifiées. Le transport des solutés peut alors être décrit comme un processus de diffusion en utilisant la notion de **coefficient de diffusion apparent ou effectif** (Loncin, 1980; Gros & Rüegg, 1987).

D'autre part, de nombreuses études ont été menées pour décrire théoriquement la diffusion de solvants ou de solutés dans les solutions, les gels ou les solides. Ces différents modèles sont basés sur différents concepts physiques (Le Feunten, 2007):

- **la théorie du volume libre** : la diffusion se produit quand le soluté « saute » dans des vides formés par la redistribution des molécules de solvant. Les espaces vides entourant les molécules de solvant sont appelés les « volumes libres ». La vitesse de diffusion est déterminée par la longueur du saut qui est à



peu près équivalente au diamètre du soluté, par la vitesse thermique du soluté et par la probabilité de présence d'un volume libre proche de la molécule de soluté ;

- **les effets d'obstruction** : les chaînes de la matrice sont considérées comme des obstacles impénétrables. Le passage d'un soluté ne peut donc se faire que par les ouvertures entre ces chaînes. Lorsque les molécules diffusantes rencontrent les chaînes de la matrice, elles sont forcées de les contourner. La distance à parcourir pour aller d'un point à un autre augmente donc en présence d'obstacles ;
- **les interactions hydrodynamiques** : elles prennent en compte les interactions hydrodynamiques présentes dans l'ensemble du système. Ces interactions incluent les interactions de friction entre le soluté et la matrice, entre le soluté et le solvant et entre le solvant et la matrice. De telles considérations permettent la description de la diffusion dans des régimes plus concentrés, notamment quand les constituants de la matrice commencent à s'enchevêtrer.

Masaro et Zhu (1999a) ont rédigé une revue très détaillée décrivant les principaux modèles de diffusion selon la théorie à laquelle ils appartiennent. Malheureusement, chaque modèle présente de nombreuses limites, en particulier pour les molécules de taille élevée et pour les milieux concentrés. Les modèles les plus simples négligent des paramètres importants comme la taille du soluté. D'autres plus complexes sont ajustés avec des paramètres variables (souvent des propriétés physiques du milieu) qui ne sont pas connus ou qui sont difficiles à évaluer. Ces paramètres étant différents pour un système soluté/polymère donné, il est la plupart du temps impossible de pouvoir prédire leurs valeurs. De plus, les significations réelles de certains paramètres d'ajustement sont très floues.

Il n'existe donc pas encore de modèle permettant une estimation précise des coefficients de diffusion dans des matrices multi-phases comme le fromage. Parmi tous les modèles disponibles dans la littérature, **celui qui paraît le plus simple à mettre en équation est celui des effets d'obstruction** (Diaz et al., 1993). On suppose alors que le réseau lipoprotéique se comporte comme un « tamis » dans lequel les solutés diffusent dans la phase aqueuse en contournant des « obstacles » immobiles, constitués par le réseau de protéines et les globules gras. Les effets d'obstruction sont liés à l'augmentation de la longueur du trajet de diffusion, caractérisé par la tortuosité de la matrice. La diffusion est uniquement ralentie par la présence du réseau lipoprotéique, qui est donc **supposé imperméable au soluté diffusant**. Elle peut être décrite par un **coefficient de diffusion effectif  $D_{\text{eff}}$**  modélisé par la loi de Fick, **à condition que les pores soient grands par rapport à la taille du soluté, avec :**

$$D_{\text{eff}} = \frac{\varepsilon}{\tau} D_{\text{aq}} \quad (3)$$

où  $D_{\text{aq}}$  est le coefficient de diffusion dans la phase aqueuse ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  est la porosité du réseau et  $\tau$  sa tortuosité.

Nous verrons dans le chapitre 3.3.4 qu'il est possible d'obtenir une estimation théorique du coefficient de diffusion d'un soluté dans la phase aqueuse du fromage à partir de la relation de Stokes-Einstein. Ceci suppose de connaître la viscosité de la phase aqueuse et la taille du soluté diffusant. En mesurant expérimentalement le coefficient de diffusion effectif du soluté dans le fromage, on peut alors accéder à un ordre de grandeur du facteur d'obstruction de la matrice sur la diffusion (rapport  $\varepsilon/\tau$ ). Cependant, il est important de garder à l'esprit que ce modèle ne permet pas de prendre en compte les limitations éventuelles de la diffusion dues aux caractéristiques physico-chimiques du soluté comme sa forme, sa flexibilité ou sa charge (interactions solutés-matrice).

### 3.3.3. Réduction de la teneur en sel des aliments: étude intégrée de la libération du sel et de sa perception dans des systèmes modèles et réels.

#### Publications N°12 et 13.

Ce programme PRA Sel (2005-2008) coordonné par C. Salles (INRA, UMR FLAVIC) faisait intervenir différents organismes de recherche français dont cinq laboratoires de l'INRA et ONIRIS (ex ENITIAA). **La question centrale de cette étude était de comprendre comment était affectée la libération du chlorure de sodium par la composition et la structure du produit lors de sa consommation ?**

#### **Objectifs**

La quantité de sodium libéré au cours du séjour de l'aliment en bouche a une influence sur l'intensité et la durée de la perception de la saveur salée. Il est donc indispensable de connaître les modalités de libération et de perception du chlorure de sodium présent dans des matrices de nature et de composition différentes. En effet, la perception salée peut varier en fonction des paramètres intervenant sur la libération des stimuli (disponibilité) tels que la structure du produit et par conséquent sa texture, mais aussi en fonction des paramètres salivaires et masticatoires. **Notre objectif était de mieux identifier les facteurs et mécanismes fonctionnels impliqués dans la perception du salé.** Ce projet reposait donc sur trois volets:

- 1) des approches physiques et de modélisation pour mieux comprendre les phénomènes de migration des solutés (sels, eau, composés d'arôme, lactate...) dans une matrice lipoprotéique modèle. Ceci peut aider à mieux contrôler la distribution des ions sodium et chlorure;
- 2) des approches physico-chimiques et psychophysiques permettant (i) de mieux comprendre comment les stimuli olfactifs et gustatifs sont libérés pendant le processus de mastication d'une matrice solide en bouche et de prédire par modélisation la libération de composés sapides pendant ce processus et (ii) faire une investigation sur les interactions arôme-saveur en étudiant comment un ou un mélange de composés d'arôme peut renforcer la saveur salée;
- 3) des investigations sur des matrices alimentaires réelles (fromages) pour valider les observations faites sur les matrices modèles.

**Répondre aux deux premiers volets présupposait d'être en mesure de caractériser les matrices d'études modèles, dont la fabrication devait être parfaitement maîtrisée. Nous disposions au STLO des compétences requises pour atteindre ces objectifs.** J'ai été particulièrement investie avec M.-H. Famelart (rhéologie) et B. Camier (technologie fromagère) sur la mise au point des matrices lipoprotéiques modèles, puis sur le premier volet de cette étude. **En ce qui concerne ce premier volet, dont j'étais responsable de la rédaction lors du montage de ce projet, nous avons soulevé les questions de recherche suivantes :**

- en fonction des caractéristiques de la matrice (taille des pores du réseau protéique, présence ou absence de grain de caillé, présence ou absence de globules gras, pH, eau libre, etc.), comment la taille et la charge des solutés affectent le phénomène de transfert de matières (outre l'étude du transfert de NaCl ou KCl, étude du transfert du lactose, du lactate et des autres ions présents dans la matrice) ?
- est-ce que la nature du contre ion associé joue sur le transfert (étude du transfert du lactate de sodium ou de calcium, comparaison avec le transfert du chlorure de sodium) ?

Nous avons décidé à l'époque d'aborder cette étude avec des dispositifs expérimentaux proches de ceux utilisés en déshydratation par immersion-imprégnation (DII), en tenant compte des contraintes de

modélisation (hypothèses simplificatrices). Cela nous a permis d'obtenir et de qualifier les profils de concentration des différents ions présents dans les différentes matrices modèles, puis de modéliser le transfert des ions sodium et chlorure dans un deuxième temps. J'ai donc mis au point un dispositif permettant de considérer un transfert unidirectionnel de transfert de matière (Figure 6).

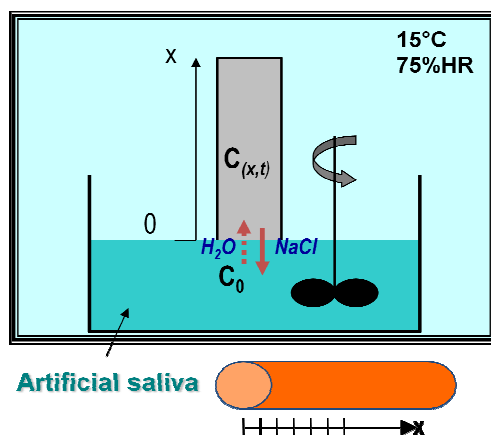


Figure 6. Schéma du dispositif expérimental de suivi de la migration du sel en matrice fromagère modèle

Les gels étaient moulés et coagulés dans des cylindres en plastique étanche, puis mis en contact avec une salive artificielle de concentration en électrolytes connue. Nous avons également placé un système d'agitation efficace de la solution (agitateur à pale) afin de réduire les facteurs limitant le transfert au niveau de la couche-limite externe. Au bout d'un temps (t) de contact entre la salive et la matrice, le cylindre était retiré de la solution et la surface en contact était rincée à l'eau désionisée. Le cylindre était alors découpé en tranches d'épaisseur comprise entre 1 et 2 mm et mesurées précisément à l'aide d'un pied à coulisse. Les teneurs en électrolytes et en eau de chacune de ces tranches étaient ensuite déterminées : les concentrations en cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) étaient mesurées par spectrométrie d'absorption atomique, tandis que l'ensemble des concentrations en anions ( $\text{Cl}^-$ , lactate,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , citrate) était obtenue par chromatographie ionique. La teneur en eau des échantillons était calculée après mesure de leur extrait sec par la méthode de référence (étuvage à  $100^\circ\text{C}$  pendant 8h), et le pH était aussi contrôlé systématiquement sur chaque échantillon. Nous avons estimé les coefficients de diffusion effectifs des différents solutés en modélisant avec la 2<sup>e</sup> loi de Fick les profils de concentration obtenus à différents temps de migration.

## Principaux résultats

### ✚ Mise au point des matrices modèles et caractérisation structurale

Nous avons développé des matrices lipoprotéiques modèles de type laitières présentant des propriétés structurales et de texture parfaitement maîtrisées et répétables, qui ont été utilisées par tous les partenaires du PRA Sel. Ces différents partenaires n'étant pas tous équipés d'un matériel de technologie fromagère suffisant pour produire des matrices fromagères dans leur laboratoire, notre stratégie a été de mettre au point des matrices lipoprotéiques modèles simulant des fromages à pâtes dures. Pour cela, nous avons choisi une formulation simple à base d'eau, de poudre de concentré de lait écrémé et de matière grasse laitière anhydre, gélifiée grâce à l'action de la présure.

Nous avons fait varier les principaux paramètres de composition ayant un rôle majeur sur la texture et la structure des matrices, comme les teneurs en protéines, matière grasse et sel, ainsi que le pH d'emprésurage. Un plan factoriel composite centré a été développé en partenariat avec un des

statisticiens du projet (P. Courcoux, ONIRIS) pour étudier l'ensemble de ces paramètres en un minimum d'expérimentations. Les changements dans les propriétés rhéologiques de ces fromages modèles ont été mesurés par analyse du profil de texture et de la distribution granulométrique des globules gras par diffusion de la lumière. Leurs microstructures ont été observées en microscopie confocale et microscopie électronique à balayage.

Pour résumer les résultats de ces travaux, **décrits en détail dans la publication N°12**, ces matrices étaient constituées par un réseau protéique dans lequel la matière grasse était dispersée sous la forme de globules de taille homogène (< 1µm de diamètre moyen), uniformément répartis dans le produit. L'augmentation du pH d'emprésurage permettait d'obtenir des diamètres moyens de globules gras significativement plus petits. Au niveau de la microstructure du réseau protéique, seul l'effet de l'augmentation de l'extrait sec dégraissé était détectable en microscopie électronique : le réseau était plus dense et plus enchevêtré que dans les matrices moins riches en protéines.

Le pH d'emprésurage et la teneur en sel avaient une influence considérable sur la texture des matrices. L'influence du pH sur la texture a été reliée aux échanges de calcium entre les protéines de la matrice et sa phase aqueuse soluble : l'augmentation du pH entraîne une ionisation des micelles de caséines et une augmentation de la fixation du calcium dans le réseau. L'effet de la teneur en sel a été plus difficile à expliquer. Le sel augmente la force ionique, ce qui affaiblit les interactions ioniques entre le calcium et les protéines et améliore la solubilité du phosphate de calcium. Cette solubilisation du calcium colloïdal entraîne une « désintégration » de la structure micellaire. En outre, le sel modifie la quantité d'eau disponible pour la structure du réseau de caséine.

### Modélisation du transfert de sel

Il était important de vérifier en premier lieu si la mesure des concentrations en sel grâce à la mesure de l'une des espèces ioniques seulement, Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup>, était une hypothèse valable. En effet, l'un des co-ions, par exemple le sodium aurait pu être retenu par les micelles de caséine chargées négativement, lors d'échanges avec le calcium. Les profils de concentration des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> obtenus lors de nos expérimentations étaient parfaitement superposés. Ces deux espèces ioniques ont donc bien migré simultanément dans la matrice modèle. Nous avons ainsi confirmé que la mesure de l'un ou l'autre de ces solutés suffisait pour caractériser la teneur en sel du produit.

Nous avons supposé que les deux flux simultanés d'eau et de sel pouvaient être décrits par le même mécanisme de diffusion : tandis que le sel est libéré de la matrice vers la salive du fait du gradient de concentration décroissant, il y a une absorption simultanée de l'eau de la solution vers la matrice. Si on suppose que les flux convectifs sont négligeables par rapport au phénomène de diffusion, la seconde loi de Fick décrivant les phénomènes de transfert de matière en condition non stationnaire peut s'appliquer :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(D \cdot \nabla(C)) \quad (4)$$

où C représente la concentration en ion Na ou Cl dans le fromage (mol.kg<sup>-1</sup>), t est le temps (s) et D le coefficient de diffusion effectif du NaCl dans le fromage (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>).

En considérant que le transfert de matière est unidirectionnel selon l'axe des x et une valeur constante du coefficient de diffusion en fonction du temps, l'équation devient :

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \cdot \nabla^2(C(x,t)) \quad (5)$$

Avec la condition initiale suivante:

$$t = 0 \quad C(x,0) = C_0$$

où  $C_0$  est la concentration initiale en  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  dans le fromage ( $\text{mol.kg}^{-1}$ ).

En considérant la solution de salive en contact avec la matrice comme parfaitement agitée, le flux convectif de solutés dans la couche limite à la surface du fromage pouvait être considéré comme non limitant. En outre le volume de salive étant largement en excès par rapport à la quantité de matrice mise en contact avec la solution, nous avons considéré que la concentration de la salive était constante. Enfin, nous avons pu considérer que le cylindre de fromage était un milieu semi-infini car le nombre de Fourier  $F_0 = D \cdot t / L^2$ , était inférieur à 0,05, où  $L$  est la longueur du cylindre (Pajonk et al., 2003).

Les conditions aux limites peuvent donc s'écrire dans ce cas:

$$t > 0 \quad C(0,t) = C_s \text{ and } C(\infty,t) = C_0$$

où  $C_s$  est la concentration en  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  dans la solution de salive artificielle.

Le paramètre inconnu  $D$  a été obtenu par minimisation de la somme du carré des écarts entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par le modèle.

La figure 7 montre un exemple type de profils de concentration en sel expérimentaux et théoriques obtenus avec l'une des matrices modèles.

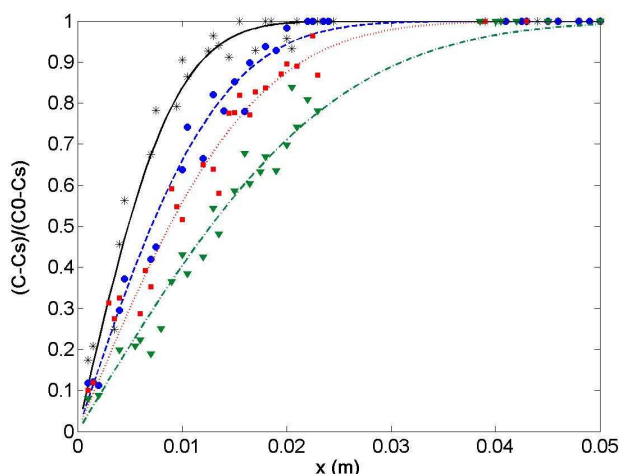


Figure 7. Exemple de profils de concentration en sel obtenus à différents temps de migration. Cas de la matrice  $370 \text{ g.kg}^{-1}$  extrait sec;  $20 \text{ g}/100\text{g}$  matière grasse/extrait sec;  $1.5 \text{ g}/100\text{g}$  sel; emprésurage à pH 6.2.  $D = 3.09 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . Les valeurs expérimentales correspondent à l'ensemble des valeurs obtenues à l'issue de 3 expériences indépendantes (\* Jour 1; ● Jour 2; ■ Jour 3; ▲ Jour 6), Modèle (traits pleins).

Les profils de concentration expérimentaux ont été modélisés de manière satisfaisante par un coefficient de diffusion effectif considéré comme constant au cours du temps. Cette conclusion était en accord avec la plupart des études publiées concernant la migration du sel dans les fromages au cours du saumurage (Publication N°14). Nous avons obtenu des valeurs de coefficients de diffusion effectifs du sel dans les différentes matrices de composition variable comprises entre  $2.81$  et  $3.43 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  à une température de  $15^\circ\text{C}$ . Ces valeurs étaient du même ordre de grandeur que les coefficients de diffusion du sel reportés dans la littérature pour des fromages d'extraits secs proches de ceux de nos matrices modèles. Concernant l'effet de la composition de la matrice, des tests statistiques portant sur les valeurs moyennes des coefficients de diffusion obtenus ont montré qu'il n'y avait pas d'influence significative du ratio matière grasse/extrait sec. Il semble donc que la présence des globules gras dans la matrice n'a pas affecté la migration des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les conditions expérimentales testées. En revanche, l'extrait sec dégraissé du produit influençait considérablement la valeur du coefficient de diffusion effectif du NaCl

dans les matrices, la diminution de celui-ci étant quasiment linéaire avec l'augmentation de l'ESD. Ceci pouvait s'expliquer par la densification du réseau protéique à mesure que la teneur en protéine augmentait, densification observée visuellement en microscopie électronique à balayage (Publication N°12).

Quant à l'effet de la teneur en sel dans le fromage modèle, nous avons montré qu'une réduction de sa concentration entraînait une diminution significative du coefficient de diffusion effectif du sel dans la matrice. Au cours de l'étude des propriétés structurales et texturales des matrices, nous avons observé en MEB que la réduction de la teneur en sel conduisait à des modifications au niveau du réseau de caséines, qui semblait plus « serré » et donc plus limitant pour la diffusion des solutés. Ces hypothèses ont été confirmées par les analyses de texture menées en parallèles, qui montraient une augmentation significative des paramètres de « dureté » et de « cohésion » des produits avec la baisse de la teneur en sel des matrices.

Enfin, le coefficient de diffusion effectif du sel augmentait considérablement lorsque le pH d'emprésurage augmentait. Nous avons expliqué également ceci du fait de l'évolution de la structure et de la texture des matrices : l'augmentation du pH permet une meilleure hydratation des micelles de caséines et donc une meilleure solubilisation des protéines, ce qui faciliterait la diffusion du sel. Au niveau textural, nous avons observé une augmentation des paramètres de « dureté » et de « souplesse » des matrices, ainsi qu'une diminution de leurs propriétés « collantes » (Publication N°12). Les résultats de cette étude ont été valorisés dans la publication N°13.

Dans la revue bibliographique que nous avons publiée en 2010 (N°14), nous avons montré qu'il est très difficile de montrer l'effet de chaque constituant de la matrice fromagère sur les propriétés de transfert du sel, car il existe de très fortes interactions entre tous les constituants, qui jouent un rôle complexe sur la microstructure du produit. Quels que soient l'origine du fromage, le type de fabrication (pâte molle, semi-dure ou dure) et sa composition (extrait sec, matière grasse et pH), les coefficients de diffusion effectifs du sel sont compris dans la littérature entre 1 and  $5.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à des températures comprises entre 10 et 15 °C (Figure 8).

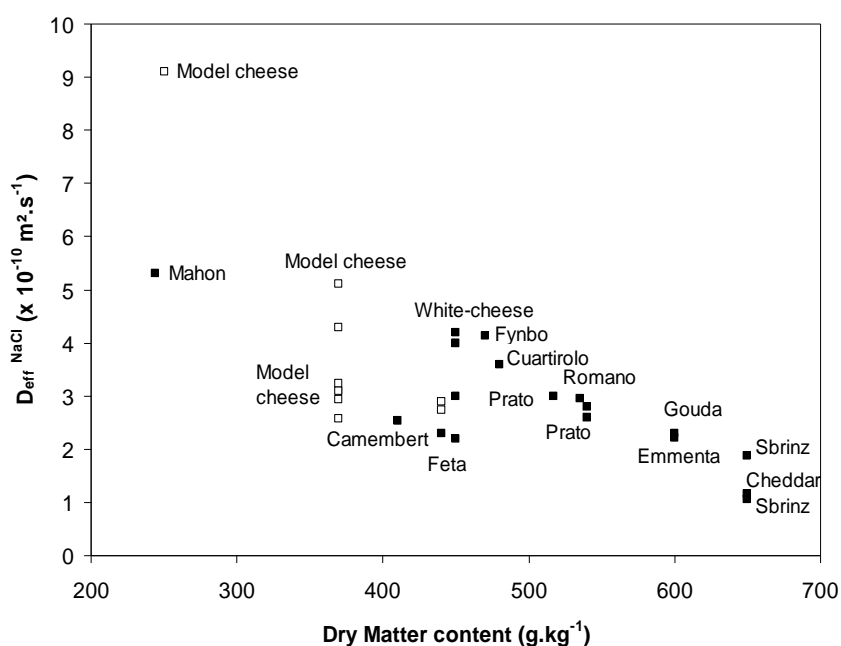


Figure 8. Coefficients de diffusion effectifs du sel en fonction de la teneur en extrait sec de différentes matrices fromagères (Floury et al., 2010).

En effectuant un test statistique sur l'influence des paramètres de composition (Extrait sec et Ratio Matière grasse/extrait sec), de température et de leurs interactions sur les valeurs de coefficients de diffusion effectifs du sel reportés dans la littérature, nous avons montré que seul le paramètre extrait sec avait une influence significative ( $p < 0.001$ ).

Toutefois, ces valeurs de coefficients de diffusion effectifs du sel doivent être considérées avec prudence, car leur comparaison est difficile. En effet, les approches et les conditions expérimentales utilisées pour déterminer ces propriétés de transfert sont très différentes selon les auteurs. De plus, outre son caractère laborieux et long, la méthode des profils de concentration offre une résolution spatiale généralement assez faible du fait de l'épaisseur des tranches, et donc une faible précision des résultats.

### ***Conclusion et bilan de ces travaux***

Nous avons modélisé avec succès le transfert du sel au cours de sa libération de matrices fromagères modèles de différentes compositions, en supposant un phénomène de diffusion effectif obéissant à seconde loi de Fick. Les valeurs de coefficients de diffusion obtenues ont pu être reliées aux différences de structure des matrices, mesurées expérimentalement par des analyses de texture et par microscopies confocale et électronique à balayage. Les profils de concentration de plusieurs autres espèces ioniques mineures (lactate, citrate, phosphate, calcium et potassium) ont également été déterminés, mais leurs allures n'ont pu être expliquées que de manière qualitative. En effet, du fait d'une trop grande incertitude sur les valeurs de concentrations obtenues, la modélisation de ces profils n'était pas envisageable.

Pourtant, il serait intéressant d'arriver à mieux comprendre le processus de migration de ces espèces ioniques en matrice fromagère, qui jouent un rôle important sur la structuration du réseau protéique au cours de l'affinage. En outre, la connaissance des propriétés de transports d'autres solutés, tels que les substrats et les métabolites issus de l'activité enzymatique des colonies microbiennes immobilisées dans le fromage, semble indispensable pour une meilleure compréhension du processus d'affinage. En effet, nous pensons que le phénomène de migration de ces solutés est probablement une des étapes limitantes de l'affinage, et expliquerait pourquoi ce phénomène de maturation est si long, de quelques semaines pour une pâte molle à plusieurs mois pour une pâte pressée...mais cela reste à prouver !

Jusqu'à présent, les propriétés de diffusion de ces solutés n'ont quasiment jamais été explorées (Publication N°14). Depuis quelques années, des méthodes expérimentales non invasives comme l'IRM, la RMN ou la FRAP, commencent à être utilisées dans d'autres domaines que le biomédical pour accéder notamment aux propriétés de transfert dans des matériaux hétérogènes. De par leur résolution spatiale, ces techniques permettent d'obtenir des profils de concentration des solutés migrants avec une précision beaucoup plus importante que la méthode classique des profils de concentration. Elles sont également beaucoup plus rapides. Malheureusement, ces techniques sont encore difficiles à appliquer à des milieux comme le fromage, du fait du caractère opaque du gel, de son hétérogénéité liée à la multitude de constituants mis en œuvre, et de l'évolution de sa structure au cours du temps.

***C'est pourquoi, suite à ce projet sur la diffusion du sel, j'ai décidé d'orienter mon projet de recherche vers la mise au point de techniques expérimentales non invasives qui nous permettraient de caractériser avec précision les propriétés de transferts de différents solutés dans nos matrices fromagères modèles, éventuellement transposables ensuite à d'autres produits alimentaires.***

### 3.3.4. Développement de nouvelles méthodologies d'exploration pour avancer dans la connaissance des mécanismes d'affinage *in situ*.

#### Comprendre l'affinage au niveau microscopique

La compréhension de l'affinage nécessite de connaître finement les acteurs en présence : les composants de la matrice, qui sont les substrats des transformations clés (protéines, lipides), et le pool d'enzymes en présence, qu'elles soient d'origine microbienne, laitière, ou ajoutées comme les enzymes coagulantes. D'innombrables travaux existent sur la description des enzymes et les cinétiques de dégradation des constituants (protéolyse, lipolyse...). Ces données sont extrêmement utiles, mais, reposant sur des quantifications après broyage des échantillons, elles ne donnent qu'une vision « moyennée ». Au mieux des gradients « macroscopiques » (entre le cœur et la croûte du fromage, par exemple) y sont décrits. Ces travaux démontrent que les cinétiques d'hydrolyse dépendent fortement du fromage considéré mais sans pouvoir identifier les facteurs limitants de ces cinétiques : diffusionnels (accessibilité enzymes/substrats) ou réactionnels (niveau d'activité enzymatique).

Du fait de l'immobilisation des bactéries dans la matrice lors de la coagulation, la croissance bactérienne se fait sous forme de colonies, qui constituent des « points chauds » d'affinage par la concentration d'enzymes qu'elles apportent localement (Figure 9). Cette dimension microscopique n'a encore jamais été explorée, et nous pensons qu'elle devrait permettre d'établir des mécanismes génériques à tous les fromages.

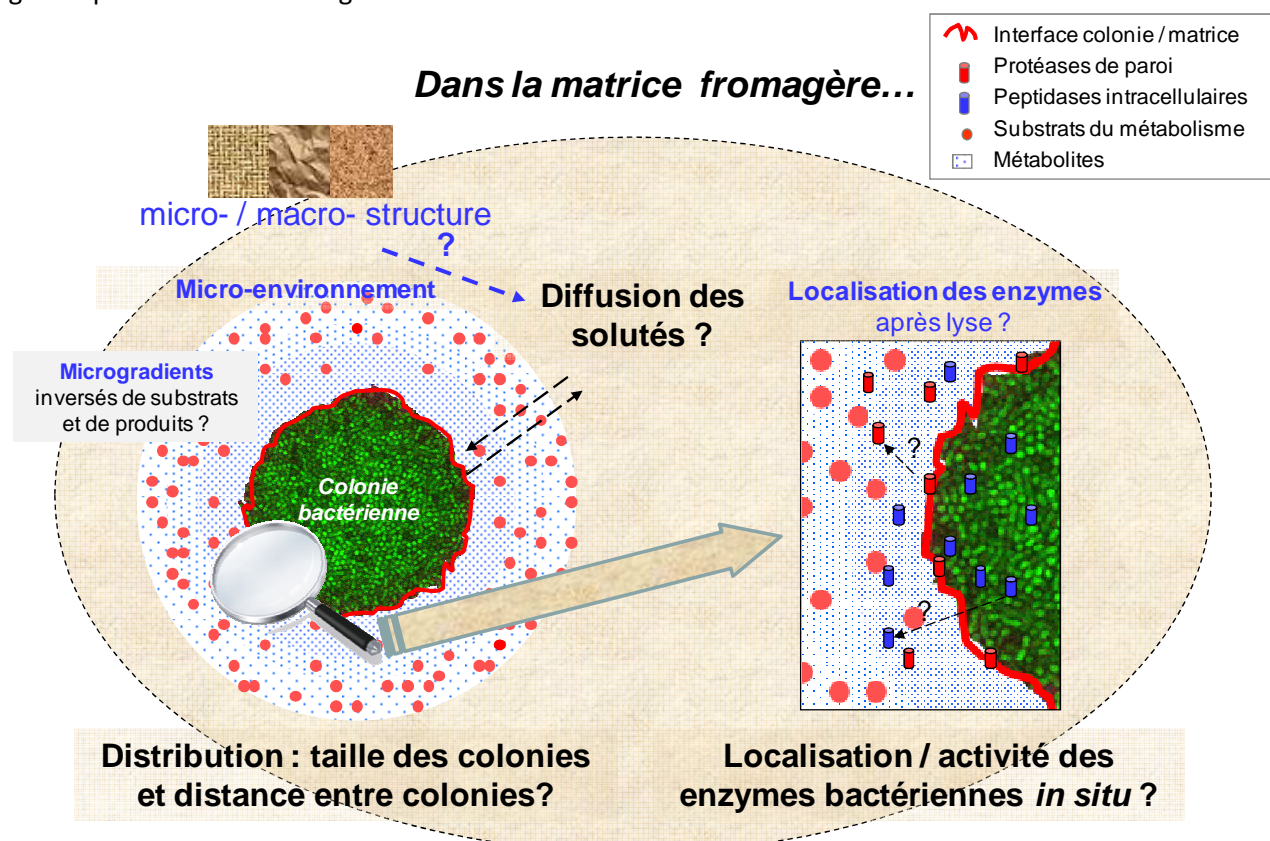


Figure 9. Représentation schématique d'une colonie bactérienne, de son interface avec la matrice fromagère et de son micro-environnement, qui constituent un « point chaud » de l'affinage du fromage.



**Mes travaux de recherche au sein de l'équipe D2R du STLO visent à explorer les mécanismes à l'échelle microscopique, à identifier des limites réactionnelles ou diffusionnelles, et à mieux connaître les interactions entre les colonies bactériennes et la matrice fromagère.** De par cette approche originale, nous pensons que les travaux proposés contribueront à améliorer tant la qualité que la sécurité microbiologique des produits laitiers, et à développer de réelles innovations.

Ainsi, les questions de recherche soulevées par cette problématique sont nombreuses et tournent principalement autour de:

- ✚ La distribution spatiale des colonies bactériennes et de la caractérisation du micro-environnement autour de ces colonies : quelle est la distance entre colonies et leur taille, qui conditionne leur aire interfaciale, en fonction du taux d'inoculation? Quelles sont les conditions physicochimiques autour des colonies? Comment explorer ce micro-environnement, résultat d'une interaction forte entre les colonies bactériennes et la matrice? Comment la distribution spatiale des colonies influence-t-elle leur activité métabolique?
- ✚ La dynamique des solutés (nutriments, métabolites) au sein de la matrice fromagère : quels sont les facteurs clés de la migration des solutés en fonction de la composition et de la microstructure de la matrice ? La migration des petits solutés engendre-t-elle des micro-gradients de pH, de potentiel Red-Ox, ou autres, qui pourraient limiter l'activité métabolique des microorganismes?
- ✚ La localisation et activité des enzymes bactériennes *in situ* : comment ce pool d'enzymes est-il distribué dans la matrice ? Comment cette distribution évolue-t-elle au cours de l'affinage? Quelles sont les facteurs limitants de l'activité enzymatique des colonies immobilisées ?

**A partir des avancées dans ces trois axes, l'enjeu de notre équipe est d'atteindre une vision intégrée des phénomènes à l'échelle de la colonie et de mettre en relation les dynamiques d'expression du potentiel du micro-organisme et les dynamiques des phénomènes physico-chimiques au sein de la matrice fromagère.**

Les micro-organismes sont utilisés ici comme des outils, et non comme des objets d'étude en soi. Les espèces ou souches bactériennes les plus appropriées à la question (existence de mutants ou de marquages spécifiques) sont mises en œuvre.

***Les réponses à ces questions ont nécessité, pour la plupart, des développements méthodologiques très chronophages et une stratégie de collaboration nationale et internationale détaillée ci-après. Sur le plan matériel, la plupart des outils nécessaires existent au sein même de l'UMR, comme la microscopie confocale. Dans l'équipe, les compétences suivantes existent : microbiologie, biologie moléculaire dont transcriptomique, enzymologie, protéomique et génie des procédés.***

***Mes compétences en génie des procédés m'ont permis de me focaliser plus particulièrement sur l'étude et la modélisation de la migration des solutés de taille, de forme et de charge variables, en lien avec la structure et la composition de la matrice fromagère et la distribution des colonies.***

*Ma contribution en matière de recherche dans ce domaine a donc principalement été :*

- (i) *de développer de nouvelles techniques expérimentales pour modéliser à l'échelle microscopique les propriétés de transfert de solutés dans des milieux complexes comme le fromage ;*
- (ii) *de déterminer les propriétés de transfert des métabolites impliqués dans les réactions enzymatiques pendant l'affinage du fromage.*

***Je tiens à préciser que la partie interactions bactéries/matrice de mes travaux de recherche est menée en étroite collaboration avec ma collègue microbiologiste S. Jeanson.***

## Collaborations équipe D2R

A l'échelle nationale et internationale, nous avons œuvré pour créer différents partenariats clés qui se traduisent dans la majorité des cas par des co-publications et qui sont résumés sur la Figure 10:

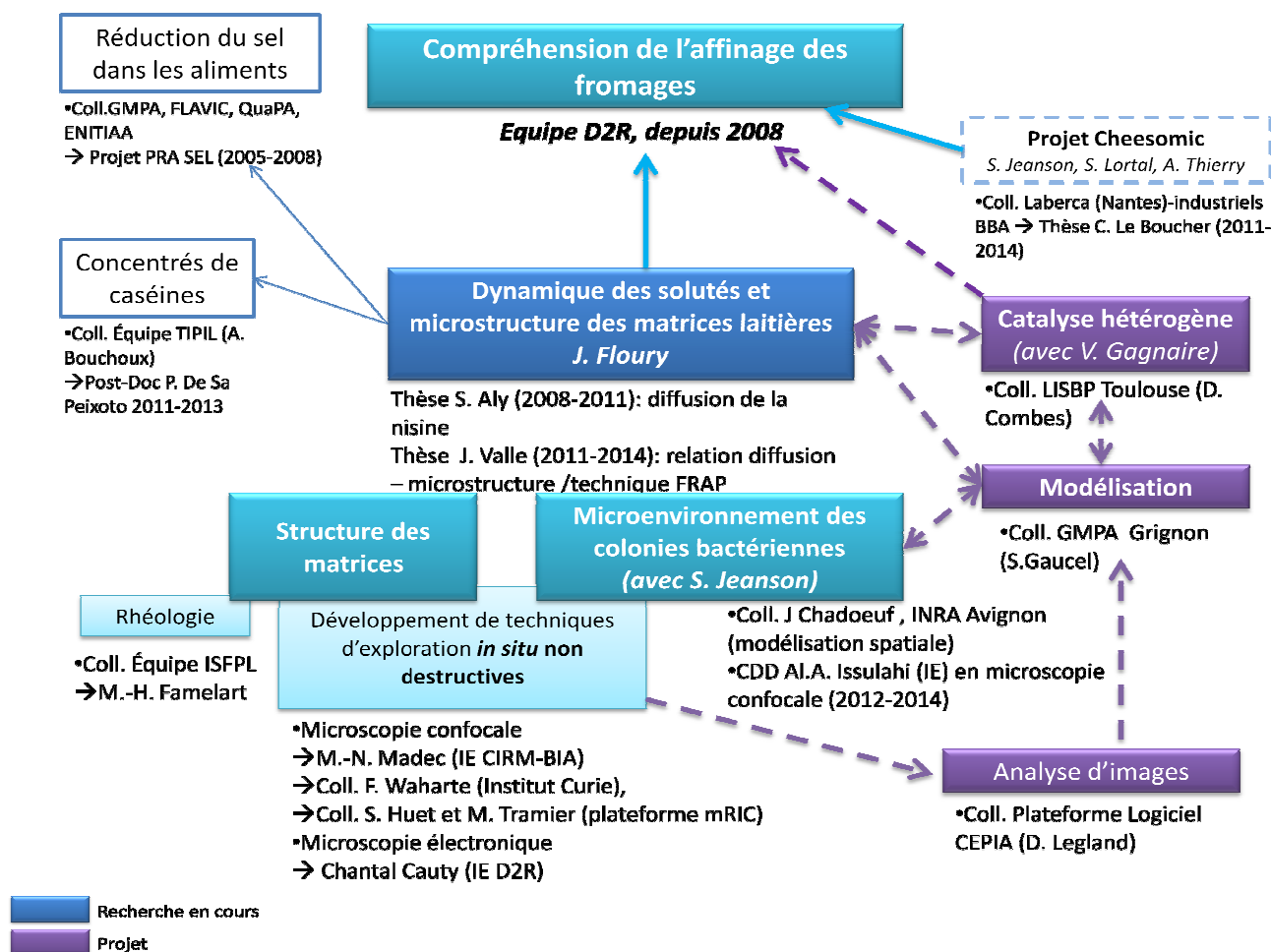


Figure 10. Schéma de l'environnement scientifique et des collaborations établies dans le cadre de mes activités de recherche menées au STLO autour de la « dynamique des solutés et microstructure des matrices laitières ».

- Dès la création de l'équipe D2R en 2008, S. Jeanson a établi une collaboration avec T. Brocklehurst (Institute of Food Research, Norwich, UK), inventeur du système gel cassette® permettant l'étude de colonies bactériennes immobilisées dans des matrices solides ;
- S. Lortal a établi une collaboration avec J. Chadoeuf (Unité de Biostatistique et Processus spatiaux, INRA Avignon) pour nous aider à modéliser la distribution spatiale des colonies bactériennes ;
- V. Gagnaire a engagé depuis 2009 un Partenariat Hubert Curien Egide Ulysse avec le Moorepark Food Research Centre (Irlande), et plus particulièrement avec J. Hannon pour développer les méthodes de détection *in situ* d'enzymes bactériennes dans des matrices fromagères ;
- Depuis 2010, j'ai établi une collaboration très fructueuse avec l'Unité PICT-IBISA de l'Institut Curie (CNRS, Paris, F. Waharte) pour modéliser la diffusion par la technique FRAP en microscopie confocale, et depuis 2011 avec la Plateforme de Microscopie de Villejean à Rennes (S. Huet et M. Tramier) pour leur expertise dans les techniques dynamiques de microscopie confocale (FRAP, FCS, FRET, FLIM...) ;

- Suite à l'école thématique « initiation à la modélisation » organisée par le PEPI Mathématiques Appliquées et Calcul Scientifique (INRA) en mai 2012, j'ai initié une collaboration avec S. Gaucel (IR GMPA, INRA Grignon) et D. Legland (Plateforme Logiciel CEPIA, INRA Grignon) pour nous aider à avancer sur les aspects modélisation et traitement d'images ;
- Enfin, je fais partie du Réseau des Microscopistes de l'INRA.

## Stratégie

**Devant la complexité des phénomènes mis en jeu au cours de l'affinage et de la structure des fromages, nous avons choisi de travailler sur un milieu modèle** plutôt que sur un fromage réel, afin de mieux cerner les phénomènes de transferts et leurs interactions avec la matrice et les colonies microbiennes. Celle-ci consiste en une fabrication sur notre plateforme technologique d'une **matrice de type fromagère maigre**, par utilisation d'une base protéique pré-concentrée, à teneur en protéine correspondant au produit final. Ainsi, un « pré-fromage » liquide stérile est préparé par microfiltration 1.4  $\mu\text{m}$  puis ultrafiltration de lait écrémé. Ce rétentat d'ultrafiltration (FRV 5) de lait écrémé peut être conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois.

Nous avons optimisé le procédé de fabrication de notre matrice fromagère modèle de manière à limiter au maximum le phénomène de synérèse du gel au cours du temps. En effet, bien que la technologie fromagère utilisée, basée sur le moulage et la coagulation d'un pré-fromage liquide, permette d'éviter la phase d'égouttage du caillé, il n'empêche que le réseau de caséines évolue continuellement après la phase de coagulation par la présure, et que sa contraction entraîne inévitablement une exsudation de lactosérum. Ce phénomène doit absolument être évité afin d'empêcher la présence de liquide entre la matrice et la lamelle constituant une des parois du système gel cassette, qui gênerait ensuite les observations au microscope confocal. C'est pourquoi, avant utilisation, le rétentat est décongelé puis traité thermiquement à  $93^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min pour dénaturer au maximum les protéines sériques (> 98%) et favoriser leurs propriétés de rétention de l'eau, ce qui permet d'éviter la synérèse du gel au cours du temps (Publication N°16). Il est ensuite directement emprésuré, et éventuellementensemencé par une souche de ferment lactique d'intérêt pour notre étude. Dans le cadre de l'étude de la dynamique des solutés, on s'affranchit des phénomènes de transferts liés aux réactions microbiennes et enzymatiques en n'ajoutant pas de ferments lactiques. Dans tous les cas, la coagulation s'opère alors directement dans le moule où la préparation a été préalablement versée, et on évite ainsi la phase d'égouttage du fromage présente dans une technologie traditionnelle. Dans la suite de ce mémoire, cette matrice obtenue à partir de rétentat maigre d'ultrafiltration emprésuré sera appelée **fromage UF modèle**.

**La plupart de nos développements méthodologiques sont basés sur une approche non destructive d'observation des phénomènes à l'échelle microscopique. Ces méthodes innovantes nécessitent donc de pouvoir observer les matrices directement au microscope confocal, sans préparation des milieux.** Grâce à la collaboration étroite établie par S. Jeanson entre notre équipe et T. Brocklehurst (IFR Norwich, UK), nous avons pu bénéficier d'un outil spécifiquement conçu par l'IFR pour l'étude de la croissance des microorganismes sous forme de colonies immobilisées en gélatine, le gel cassette®. Nous sommes les premiers à l'avoir adapté à une matrice alimentaire opaque (Figure 11).

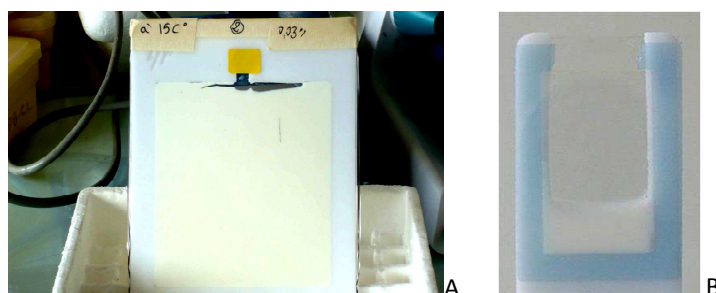


Figure 11. A) Gel cassette® (100x100x2mm) rempli de fromage UF modèle coagulé entre deux couches de PVC d'une épaisseur de 2 mm. B) Gel cassette® de la taille d'une lame de microscope que nous avons adaptée à nos besoins entre lame et lamelle (épaisseur 2,1 mm).

Nous appliquerons différents traitements technologiques à ce fromage UF modèle pour complexifier progressivement et de manière parfaitement contrôlée la structure du réseau protéique et la texture de la matrice, et voir ainsi comment ces modifications influencent la dynamique des solutés.

## Principaux résultats

### Diffusion et activité de la nisine

#### Publications N°16 et 18.

Existe-t-il des limites diffusionnelles de substrats et/ou de métabolites à proximité des colonies microbiennes, et quels sont les facteurs clés impliqués (structure des matrices, caractéristiques des solutés) ? Mon objectif est de modéliser la migration de ces solutés *in situ* dans des matrices fromagères modèles, et d'établir le lien théorique entre la diffusion, les caractéristiques physico-chimiques des solutés et la structure des matrices pour mieux maîtriser à terme l'activité bactérienne *in situ*.

***Depuis mon intégration dans l'équipe D2R, j'ai consacré la majorité de mon temps au développement d'outils originaux, basés sur la microscopie confocale, permettant l'étude de la migration de solutés à l'échelle microscopique.***

Comme je l'ai indiqué précédemment, aucune donnée concernant la diffusion de métabolites d'origine protéique n'avait été reportée dans la littérature. Le choix du soluté s'est d'abord porté sur la nisine, petit peptide chargé positivement d'environ 3500 Da. Cette molécule constitue un modèle intéressant de soluté représentatif de métabolites produits par les colonies bactériennes pendant l'affinage. En effet, la nisine est un peptide antimicrobien naturel produit par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, qui inhibe un large spectre de bactéries gram-positives. Ce peptide est d'ailleurs largement utilisé en fabrication fromagère pour améliorer la conservation du fromage. En plus de son activité antimicrobienne exploitée pour la bioconservation des aliments, la nisine (et possiblement d'autres bactériocines) revêt un intérêt particulier comme inducteur de lyse cellulaire dans le fromage, permettant ainsi de contrôler et d'accélérer l'affinage de certains fromages. Suite à sa production *in situ* par les lactocoques, la nisine est capable d'inhiber la croissance de microorganismes indésirables. Nous en avons déduit, même si cela n'a jamais été prouvé, que cette molécule était donc probablement capable de migrer dans de telles matrices.

En outre, cette petite bactériocine présente la caractéristique intéressante pour la microscopie confocale de rendre fluorescente à son contact une souche mutante (*L. lactis* LAC275, dite « souche NICE ») développée par Hakovirta et al. (2006). D'après ces auteurs, l'intensité de la fluorescence des souches (en milieu liquide) est également censée être linéairement corrélée à la concentration en nisine (dans une certaine gamme de concentration) et peut donc servir à doser cette molécule en milieu alimentaire.

J'ai donc dans un premier temps essayé de mettre au point un système expérimental de suivi de la migration de la nisine dans une matrice fromagère modèle à l'aide du système gel cassette<sup>®</sup>. Pour provoquer le transfert de nisine au sein de la matrice, un gradient de concentration en nisine était établi en mettant en contact une fraction de matrice enrichie en nisine à une concentration connue  $C_0$  et une fraction de matrice d'épaisseur  $d$  bien définie ne contenant pas de nisine. Ensuite, un milieu gélosé nutritif contenant les souches *L. lactis* LAC275 était ajouté à la surface du système. Sur le principe, le coefficient de diffusion effectif de la nisine dans la matrice choisie est modélisable à partir de la seconde loi de Fick, connaissant le temps d'apparition de la fluorescence pour une distance de migration  $d$  donnée (variable). Le transfert de matière est supposé monodirectionnel dans la géométrie retenue (Figure 12).

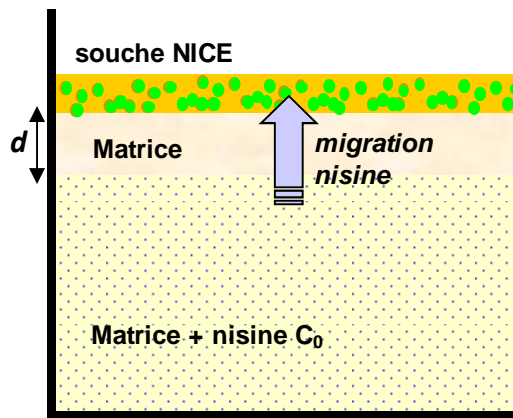


Figure 12. Schéma de principe du dispositif expérimental de suivi par microscopie confocale de la migration de la nisine en utilisant les propriétés fluorescentes d'une souche de *L. lactis* transformée pour exprimer le gène *gfp* sous contrôle de l'opéron *nisine* (NICE).

En réalité, de nombreuses complications expérimentales sont venues peu à peu assombrir les perspectives de réussite de ce dispositif inédit ! Premièrement, les souches mutantes ne fluoresçaient pas instantanément au contact de la nisine et ce délai d'apparition de la fluorescence s'est avéré très variable (conditions opératoires difficilement répétables). De plus, il s'est avéré que l'intensité de fluorescence des souches présentes sous forme de colonies dépendait fortement du stade de croissance de chaque cellule dans la colonie, et donc n'était pas le même dans toutes les colonies au même moment. Comment en déduire alors le niveau de concentration en nisine atteint dans cette couche de gélose à l'instant  $t$  ? Après plusieurs mois d'essais de mise au point du protocole, nous avons préféré mettre de côté cette technique.

En parallèle, l'étude la diffusion de la nisine dans des matrices fromagères modèles de différentes compositions a été menée dans le cadre de la **thèse de S. Aly (2008-2011)** par la mise au point d'une **technique microbiologique originale de mesure indirecte de la migration de ce soluté**. Ce travail a nécessité un encadrement très « rapproché » de la doctorante par S. Jeanson et moi-même.

Afin de **valider cette méthode, nous avons modélisé en parallèle les coefficients de diffusion apparents de la nisine grâce à la méthode classique des profils de concentration** dans les différentes matrices modèles. Toutefois, et c'est sans doute la raison pour laquelle personne n'avait jamais déterminé jusqu'à présent les propriétés de transport de protéines au sein d'une matrice laitière, **un verrou restait à lever : être capable de tracer spécifiquement la nisine au sein d'une matrice composée essentiellement de protéines**. Nous avons levé ce verrou en développant avec l'aide de D. Dupont (DR, biochimiste au STLO) une méthode de dosage immuno-enzymatique sur support solide de la nisine (test ELISA), qui permet de détecter les différents épitopes constitutifs de la structure protéique cible dans un milieu complexe.

Quant à **notre approche microbiologique, elle était fondée sur l'hypothèse que le taux de mortalité d'espèces ciblées sensibles à la nisine pourrait être reliée, au moins partiellement, à la vitesse de migration de cette bactériocine dans la matrice considérée**. La technique consistait donc à inoculer simultanément dans la matrice avant emprésurage un couple de souches, l'une productrice de nisine (*L. lactis* subsp. *Lactis*) et l'autre sensible à la nisine (*Lactobacillus sake*). Les taux d'inoculation de ces souches étaient parfaitement contrôlés de manière à pouvoir estimer la distance entre les colonies immobilisées à partir du modèle de distribution spatiale développé par S. Jeanson et J. Chadoeuf (Publication N°15).

Pour faire varier la structure de la matrice modèle, nous avons choisi pour ce projet d'incorporer de la gélatine à différentes concentrations à notre fromage UF modèle, en prenant la précaution majeure de garder un extrait sec et une activité d'eau constante. En effet, nous voulions déterminer seulement

l'impact de la microstructure du réseau gélifié sur la migration de la nisine. La teneur en extrait sec et l'activité d'eau étant les deux paramètres majeurs influençant la dynamique des solutés, il fallait absolument arriver à s'en affranchir en travaillant avec des valeurs constantes de ces paramètres. Le choix de la gélatine se justifiait par le fait que cette protéine est largement utilisée en industrie laitière pour ses nombreuses propriétés fonctionnelles, et rentre notamment dans la composition de produits gélifiés à teneur réduite en matière grasse (type yaourts ou fromages).

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à relier les résultats de cette approche « microbiologique » aux mesures des coefficients de diffusion effectifs de la nisine effectuées dans les matrices de même composition. Pour expliquer ces résultats apparemment contradictoires sur le plan de la cinétique de migration de la nisine, nous avons formulé de nombreuses hypothèses, qui ont été ensuite testées par S. Aly lors d'expérimentations complémentaires. Les résultats et conclusions de cette approche microbiologique sont reportés dans la publication N°18.

Sans rentrer dans le détail de tous les résultats de ces expériences, **le bilan majeur de ce projet a été l'obtention, pour la 1<sup>e</sup> fois, du coefficient de diffusion d'un peptide dans un fromage modèle.** Ainsi, les coefficients de diffusion de la nisine modélisés à partir des profils de concentrations et de la loi de Fick étaient respectivement de  $50 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  dans la matrice sans gélatine et de  $34 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  dans celle avec gélatine. Devant la lourdeur de cette technique expérimentale, surtout au niveau de la mesure des concentrations en nisine par ELISA, les expérimentations n'ont été répétées que deux fois mais les profils de concentration étaient reproductibles. Même si les valeurs de coefficients de diffusion obtenues étaient très proches et du même ordre de grandeur que dans un gel d'agarose (Sebti et al., 2004), ils étaient significativement différents dans les deux matrices de compositions différentes testées, avec une diminution du coefficient de diffusion quand la gélatine était présente dans le réseau. Cette tendance à la baisse du coefficient de diffusion effectif des solutés dans la matrice contenant la gélatine par rapport au fromage UF modèle a d'ailleurs été confirmée par des mesures de coefficient de diffusion de FITC-dextrans de taille comparable à la nisine (4 kDa) réalisée avec la technique de FRAP (voir paragraphe suivant).

Nous avons pu justifier cette différence grâce aux mesures d'activité d'eau et aux analyses structurales des différentes matrices par microscopie confocale, qui ont montré que l'ajout de gélatine modifiait considérablement la microstructure de la matrice modèle (Figure 13). Pour cela, nous avons marqué spécifiquement la gélatine avec la fluorescéine (FITC), qui fluoresce dans le vert. Après purification de la gélatine marquée, nous l'avons incorporée au rétentat d'UF, dont les protéines ont été marquées au Bleu de Nile (fluoresce dans le bleu).

On s'aperçoit en observant la figure 13, qu'à l'échelle microscopique, la matrice contenant de la gélatine était très hétérogène par rapport au fromage UF modèle. Les deux types de protéines, gélatine et laitières, n'interagissaient donc pas lorsqu'elles étaient mélangées dans la matrice pour former un réseau continu, mais au contraire formaient deux réseaux distincts. De plus, bien que les deux matrices avaient la même teneur en eau (79%) et le même pH ( $6.64 \pm 0.01$ ), l'activité moyenne de l'eau de la matrice à base de gélatine ( $0.967 \pm 0.004$ ) était significativement ( $p < 0.01$ ) inférieure à celle composée uniquement de rétentat d'UF ( $0.989 \pm 0.003$ ), car la gélatine a un très fort pouvoir de rétention de l'eau.

De ce fait, la diminution du coefficient de diffusion effectif de la nisine dans la matrice contenant la gélatine devait probablement être liée à l'hétérogénéité de structure du milieu. En effet, pour nous, la gélatine, dans laquelle la nisine migre très difficilement car l'eau est très fortement liée aux protéines, entraîne une augmentation de la tortuosité du réseau constitué du mélange gélatine/protéines laitières. Ceci correspond à une augmentation de la « longueur relative » de parcours de la nisine, qui engendre une baisse globale de son coefficient de diffusion effectif.



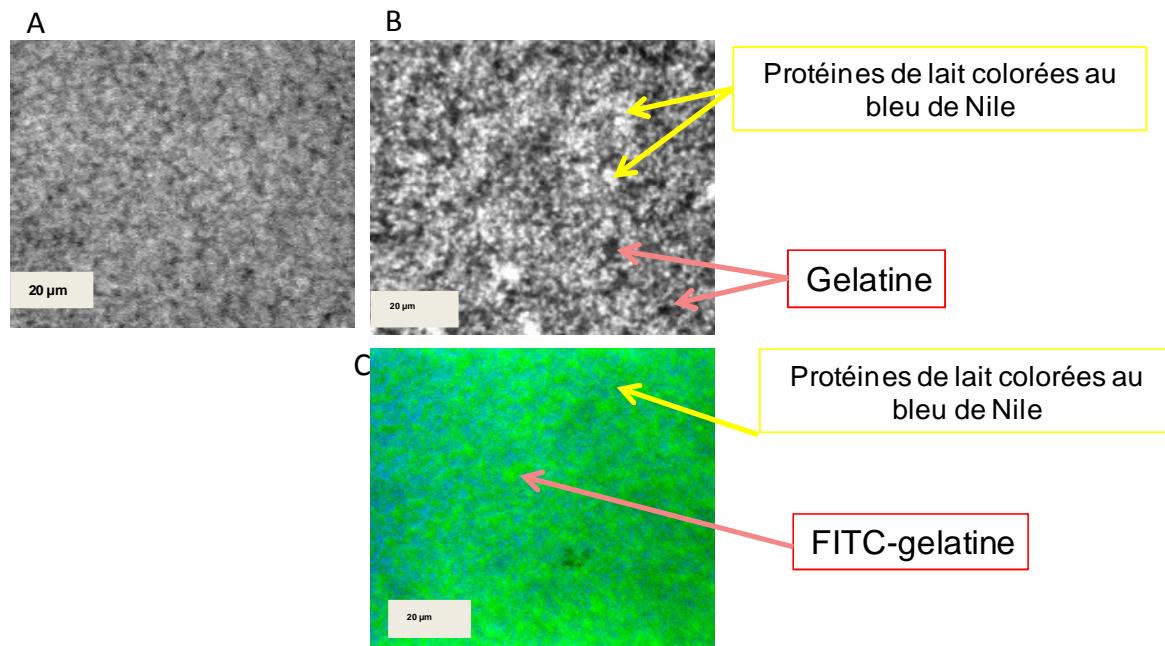


Figure 13. Observations en microscopie confocale de la microstructure du fromage UF modèle sans gélatine (A) et avec 10% de gélatine préalablement marquée au FITC (B et C).

Au contraire, l'approche microbiologique a révélé que la gélatine permettait d'améliorer de façon spectaculaire l'efficacité de la nisine Z, produite *in situ* par les lactocoques, sur l'inactivation de *Lactobacillus sakei*, alors qu'on pensait obtenir le résultat inverse si la diffusion avait été le facteur limitant. Ainsi, les cinétiques de perte de viabilité de *Lb. sake* observées étaient très différentes selon les matrices. Après 24 h, la perte de viabilité variait de  $0.33 \pm 0.11$  à  $3.21 \pm 0.01 \log_{10}$  cfu/g dans les matrices respectivement sans et avec 10% de gélatine.

Pourtant, les expérimentations complémentaires ont démontré que la présence de gélatine dans la matrice protéique n'a affecté ni la croissance du lactocoque, ni la quantité totale (mesurée par le test ELISA) et active (mesurée par un test d'agar diffusion) de nisine produite. En revanche, la quantité finale de lactate produite était supérieure, et le pH final légèrement plus bas (0.2 unité de pH), dans les matrices avec gélatine. D'après la littérature, différentes hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces résultats ; les plus plausibles semblent être une interaction moindre de la nisine avec la gélatine *versus* la caséine qu'elle remplace, et la légère différence de pH final qui favoriserait la libération de la nisine de la colonie productrice de *Lc. lactis*.

Ces résultats ont permis de montrer que l'incorporation de gélatine, déjà pratiquée dans certains produits industriels, augmente l'efficacité *in situ* de la nisine, mais que la mesure de la concentration de nisine ne permet pas de présager de son efficacité *in situ* dans une matrice alimentaire.

## 🚧 Développement de la technique FRAP en microscopie confocale

### Publications N°17 et 20

#### Contexte et stratégie

*Devant les difficultés rencontrées avec les méthodes basées sur des phénomènes microbiologiques au cours de mon projet avec la souche NICE ainsi que de la thèse de S. Aly, j'ai décidé de changer de stratégie. Mes recherches m'ont conduit à m'intéresser plus particulièrement aux domaines de la biophysique et du médical, et en particulier ceux de l'imagerie cellulaire et tissulaire.*

En effet, depuis quelques années, les chercheurs développent des techniques de mesures très puissantes et non destructives de la dynamique de solutés, telle que la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), basées essentiellement sur la microscopie confocale. Il « suffisait » d'arriver à transposer cette technique à nos matrices alimentaires, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'à présent. La principale difficulté à surmonter a été principalement liée à l'opacité de nos matrices par rapport aux milieux cellulaires, tissus ou gels transparents habituellement analysés par ces techniques. Ceci a représenté pour moi un challenge très intéressant et m'a permis de nouer des collaborations étroites avec des chercheurs en biologie médicale qui, à mon étonnement, ont accueilli mon projet avec beaucoup d'enthousiasme, l'idée de travailler sur des fromages leur paraissant fort « sympathique » !

Au cours des 30 dernières années, la technique de FRAP (Figure 14), est devenue une technique très importante et polyvalente pour étudier la mesure du trafic et des mouvements dans et entre les compartiments cellulaires ou au niveau des membranes biologiques (Carrero et al., 2003 ; Reits & Neefjes, 2001 ; Oancea & Meyer, 1998; Oancea et al., 1998).

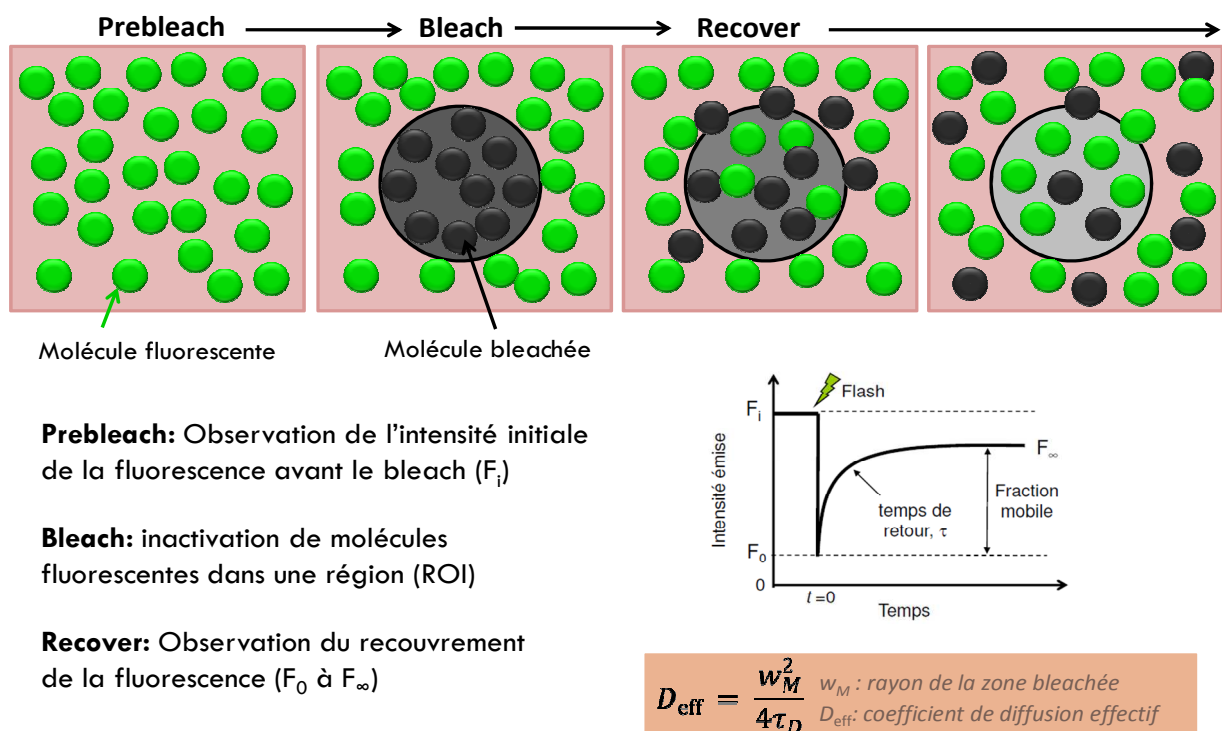


Figure 14. Principe de la technique de FRAP.

Cette technique a fait l'objet d'un important développement avec notamment l'introduction de protéines fluorescentes chimériques, marquées par la GFP, dont la stabilité photochimique est grande. Cette technique a par exemple été utilisée pour mesurer l'intensité et la vitesse du passage d'une protéine de son lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique, à son lieu de maturation, l'appareil de Golgi (Presley et al., 1997), ainsi que la vitesse de renouvellement d'une protéine membranaire, sa vitesse de diffusion latérale dans les membranes, et la vitesse comparée des différentes voies d'endocytose.

La technique FRAP consiste à illuminer temporairement et de manière irréversible une portion d'un échantillon avec une forte intensité de lumière, de manière à provoquer une extinction localisée (photobleaching ou photoblanchiment) de la fluorescence, puis à mesurer la cinétique de réapparition de la fluorescence dans la zone concernée (Figure 13). En traçant la relation entre l'intensité de fluorescence et le temps, la mobilité des molécules fluorescentes peut être mesurée directement (Carrero et al., 2003). L'approche la plus courante pour décrire la mobilité des molécules au cours d'une expérience de FRAP est de supposer que la dynamique spatiotemporelle de ces molécules est un phénomène de diffusion pure, modélisé par la seconde loi Fick. Deux paramètres peuvent alors être dérivés d'une expérience de FRAP : la fraction mobile, qui correspond à la quantité de fluorescence effectivement récupérée après le photoblanchiment et le temps caractéristique de diffusion ( $\tau_0$ ). La valeur de la fraction mobile est influencée par les interactions de la molécule fluorescente avec d'autres molécules ou une membrane. Le temps caractéristique de diffusion est quant à lui proportionnel au coefficient de diffusion effectif de la molécule fluorescente ( $D_{\text{eff}}$ ), qui dépend des propriétés hydrodynamiques de la molécule observée et de son environnement.

Cette technique, dans lequel la concentration de la sonde fluorescente est micromolaire, est non seulement microscopique, non destructive et peu invasive (Axelrod et al., 1976), mais elle permet également de couvrir une large gamme de coefficients de diffusion effectifs, compris entre  $10^{-20}$  et  $10^{-9}$   $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Karbowiak et al., 2006). **Cependant, malgré l'utilisation très répandue de la microscopie confocale pour effectuer ces expériences de photoblanchiment, la quantification des paramètres cinétiques est souvent critiquable dans la littérature du fait de l'utilisation de modèles inappropriés à l'analyse des données expérimentales, surtout dans le cas où les solutés diffusent rapidement.** En effet, dans ce cas, on ne peut pas négliger le processus de diffusion qui a lieu pendant la phase de photoblanchiment (Braga et al., 2004). Ces auteurs ont développé un nouveau modèle qui présente l'avantage de prendre en compte la diffusion de molécules très mobiles au cours de la phase photoblanchiment. Ce modèle m'a particulièrement interpellée puisqu'il a été repris par Waharte et al. (2010) pour mesurer des coefficients de diffusion locaux dans des biofilms « vivants », systèmes qui se rapprochent donc d'avantage de nos matrices alimentaires que les milieux cellulaires habituellement étudiés par cette technique de FRAP.

**En effet, en dépit de son intérêt, à l'époque où j'ai commencé à m'intéresser à cette technique (en 2010), la technique de FRAP n'avait jamais été appliquée à des mesures de diffusion dans des milieux alimentaires.** Seuls Perry et al. (2006) avaient publié une étude dans laquelle ils avaient mesuré les coefficients de diffusion de sondes FITC-dextrans dans des solutions d'amidon de différentes concentrations. Depuis, Carvajal-Rondanelli et Lanier (2010) ont appliqué la technique de FRAP à de la chair de poisson afin de modéliser les coefficients de diffusion de différentes molécules inhibitrices de la protéase, marquées par la FITC, entre les membranes cellulaires des fibres musculaires ; et plus récemment, Svanberg et al. (2011) ont également utilisé la technique FRAP pour corrélérer les propriétés de diffusion de petits solutés dans une matrice beurre de cacao aux caractéristiques structurales de la matrice.

**Devant autant de potentialités prometteuses de cette technique, sous réserve bien entendu de choisir un modèle approprié à la quantification des données expérimentales, j'ai donc tenté d'adapter**

**pour la première fois la FRAP à nos matrices fromagères afin de modéliser la migration des solutés à l'échelle microscopique et de manière non destructive.**

Pour mettre au point la technique sur nos matrices fromagères modèles, j'ai choisi de commencer par étudier la diffusion de solutés fluorescents commerciaux de tailles croissantes (4 à 2000 kDa), les FITC-dextrans. En développant le marquage d'autres molécules, il est aussi possible d'envisager d'évaluer les phénomènes de limitation de la diffusion liés soit aux interactions solutés-matrices, dues à la charge et/ou à l'hydrophobicité de la molécule, soit aux effets de forme du soluté (molécule flexible vs rigide). **Nous avons donc effectué le marquage par la fluorescéine (FITC) de protéines globulaires et chargées négativement au pH de nos matrices ( $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline et BSA), afin de comparer leurs propriétés de transfert à celles des dextrans, qui sont des polymères neutres et flexibles.** Le protocole de préparation des protéines marquées avec la sonde fluorescente FITC est décrit en détail dans la publication n°20.

### Développement de la technique de FRAP pour étudier la diffusion en matrice fromagère

*Pour m'aider dans le choix des paramètres expérimentaux et la modélisation des données, j'ai initié en 2010 une collaboration avec F. Waharte, spécialiste des techniques de microscopie dynamique telles que la FRAP sur la plateforme IBISA à l'Institut Curie (CNRS, Paris). Les résultats très prometteurs obtenus à l'issue des premiers travaux ont été valorisés rapidement lors de deux présentations orales dans des congrès internationaux et dans une publication (n°17). Ils m'ont surtout permis d'encadrer d'abord un stage de Master 2 (G. Lollia) pendant 6 mois en 2011 et d'obtenir un financement de thèse INRA CEPIA/Région Bretagne pour la période 2011-2014 (J. Valle Costa Silva). J'ai également été sollicitée par G. Gezan-Guiziou et A. Bouchoux pour participer à l'encadrement d'un post-doc (P. de sa Peixoto) visant à caractériser des milieux protéiques concentrés (2011-...).*

Il nous a été possible d'obtenir des courbes de redistribution de la fluorescence exploitables mathématiquement sur notre fromage UF modèle, ce qui n'était pas évident *a priori*. Pour modéliser les coefficients de diffusion, nous avons choisi une approche alternative (Braga et al., 2004) par rapport aux méthodes classiquement utilisées dans la littérature. Cette approche présente l'avantage de tenir compte du phénomène de diffusion des molécules pendant la phase de blanchiment, ce qui est particulièrement important pour les petits solutés qui diffusent très rapidement. En effet, comme on peut le constater sur les images de la figure 15a, qui sont les premières photos obtenues juste après la phase de photoblanchiment d'une zone circulaire, lorsqu'on photoblanchit des molécules immobiles, la taille de la zone réellement photoblanchie est identique à celle définie au départ par l'expérimentateur (correspond au trait blanc et notée ROI).

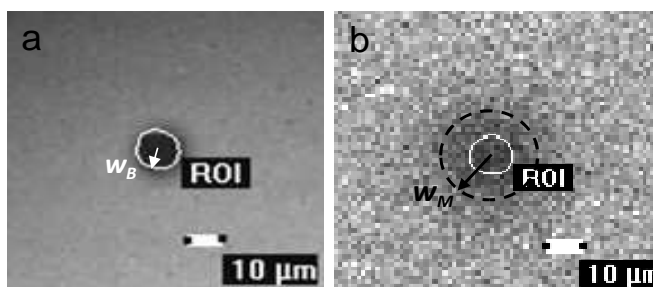


Figure 15. 1<sup>re</sup> image obtenue après le photoblanchiment (a) soluté immobile; (b) FITC-dextran en fromage UF modèle.

En revanche, si on regarde la première image obtenue après photoblanchiment des molécules de FITC-Dextran (Figure 15b), on s'aperçoit que la zone photoblanchie est bien plus grande que celle définie au départ et beaucoup moins foncée que dans le cas des molécules immobiles. Ceci est dû au fait que les molécules photoblanchies ont migré en dehors de la zone définie, tandis que des molécules fluorescentes sont revenues dans le cercle pendant le délai entre la fin du photoblanchiment et la première acquisition de l'image sur le microscope.

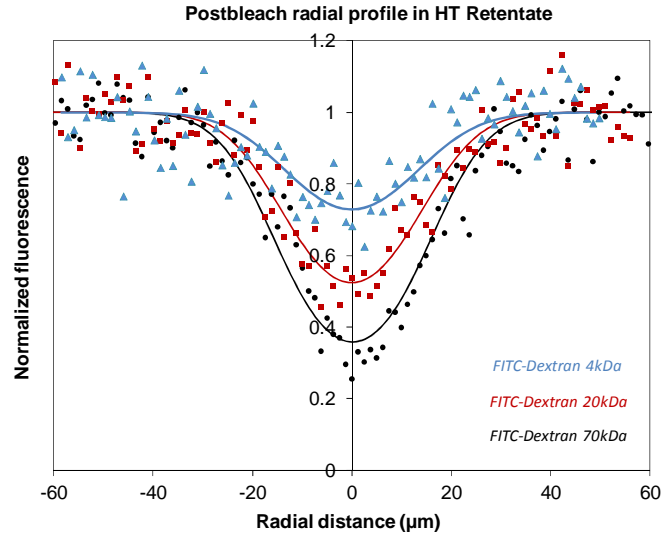


Figure 16. Profils radiaux d'intensité de fluorescence normalisée des FITC-dextrans obtenus sur la 1<sup>re</sup> image acquise après la phase de photoblanchiment lors d'une expérience de FRAP sur le fromage UF modèle.

Nous avons modélisé ces profils radiaux d'allure Gaussienne (Figure 16) à l'aide de l'équation 6 :

$$F_M(r,0) = \exp\left(-K_M \exp\left(-2 \frac{r^2}{w_M^2}\right)\right) \quad (6)$$

Cette équation permet de déterminer 2 paramètres,  $w_m$  et  $K_m$ , qui représentent respectivement le rayon de la zone photoblanchie au moment de la première observation juste après le photoblanchiment, et l'efficacité du photoblanchiment pour la molécule considérée. Les paramètres  $K_m$  et  $w_m$  déterminés précédemment sont ensuite réinjectés dans l'équation modélisant la cinétique de récupération de fluorescence en fonction du temps, qui est basée sur l'hypothèse que la diffusion des solutés obéit à la loi de Fick (Equation 7):

$$F_M^{2D}(t) = \frac{F_0}{2} \left[ \frac{w_M^2}{w_B^2} \left[ \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{(-K_M)^n}{n!n} \left( 1 - \exp\left(\frac{-2n}{1 + 2n \frac{t}{\tau_D}} \cdot \frac{w_B^2}{w_M^2}\right) \right) \right] \right] + 2 \quad (7)$$

On obtient par minimisation du carré des écarts entre le modèle et les points expérimentaux, le temps caractéristique  $\tau_D$  du soluté migrant dans la matrice (s). On en déduit enfin le coefficient de diffusion effectif du soluté ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ) à partir de la relation 8 :

$$D = \frac{w_M^2}{4\tau_D} \quad (8)$$

Où  $w_m$  correspond au rayon de la zone photoblanchie issue de la première observation après le photoblanchiment (Equation 6).

### Validation du protocole dans l'eau

Le protocole de FRAP et la modélisation des données ont été validés par comparaison des rayons hydrodynamiques, obtenus à partir des coefficients de diffusion expérimentaux de l'ensemble des solutés testés (FITC-dextrans et protéines) grâce à la relation de Stokes-Einstein, aux valeurs publiées dans la littérature. D'après le Tableau 1, les rayons hydrodynamiques obtenus à partir de nos mesures de diffusion dans l'eau étaient très proches voire identiques aux valeurs publiées par différents auteurs pour l'ensemble des solutés.

*Tableau 1. Masses moléculaires ( $M_w$ ) et coefficients de diffusion expérimentaux des différents solutés (FITC-dextrans and FITC-protéines) dans l'eau ( $D_{water}$ ) à 20°C et leurs rayons hydrodynamiques correspondants (calculated radius). Ces valeurs sont comparées avec les données de la littérature (nominal radius).*

Solutes	Mw (kDa)	<sup>1</sup> $D_{water}$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	<sup>2</sup> Calculated $R_h$ (nm)	<sup>3</sup> Nominal $R_h$ (nm)	Reference
FITC-D4	4	$102 \pm 5.3$	$2.1 \pm 0.1$	1.4	(Sigma-Aldrich)
FITC-D10	10	$66 \pm 2.2$	$3.2 \pm 0.1$	2.3	(Sigma-Aldrich)
				2.7	(Prausnitz and Noonan, 1998)
				2.86 – 5.12	(Hagman et al., 2010)
FITC-D20	20	$44 \pm 2.6$	$4.9 \pm 0.3$	3.2	(Nugent and Jain, 1984)
				3.3	(Sigma-Aldrich)
FITC-D40	40	$43 \pm 1.8$	$5.0 \pm 0.2$	4.5	(Sigma-Aldrich)
				4.62	(Nugent and Jain, 1984)
				5.0	(Prausnitz and Noonan, 1998)
				5.5	(Balakrishnan et al., 2012)
FITC-D70	70	$33 \pm 1.7$	$6.5 \pm 0.2$	5.79	(Nugent and Jain, 1984)
				6.0	(Sigma-Aldrich)
				6.4	(Prausnitz and Noonan, 1998)
				7.4	(Lebrun and Junter, 1993)
FITC-D250	250	$25 \pm 1.2$	$8.6 \pm 0.4$	6.0	(Payet et al., 2008)
				10.6	<sup>4</sup> Extrapolated value
FITC-D500	500	$21 \pm 1.1$	$10.2 \pm 0.5$	12.05 – 21.92	(Hagman et al., 2010)
				14.7	(TdB Consultancy)
FITC-D2000	2000	$9 \pm 2.2$	$23.8 \pm 4.7$	26.0	(Pluen et al., 1999)
				27.0	(TdB Consultancy)
				27.2	(Lebrun and Junter, 1993)
				50.0	(Balakrishnan et al., 2012)
FITC- $\alpha$ -LA	14	$102 \pm 7.3$	$2.09 \pm 0.1$	1.90	(Saltzman et al., 1994)
				2.12	(Johnson et al., 1996)
FITC- $\beta$ -LG	18	$85 \pm 5.4$	$2.50 \pm 0.1$	2.6	(Beretta et al., 2000)
FITC-BSA	66	$59 \pm 8.6$	$3.65 \pm 0.5$	3.5	(Sigma-Aldrich)
				3.55	(Nugent and Jain, 1984)
				3.59	(Johnson et al., 1996)
				3.93	(Pluen et al., 1999)

<sup>1</sup>Diffusion coefficient in water at 20°C determined by FRAP

<sup>2</sup>Radius calculated from the Stokes-Einstein equation ( $R_h = k_B T / 6\pi\mu D_{water}$ ), where  $k_B$  is Boltzmann's constant, T is absolute temperature,  $\mu$  is the viscosity of water (1 mPa.s), and  $D_{water}$  is the diffusion coefficient in water at 20°C determined by FRAP

<sup>3</sup>Literature data expected from diffusion data with their respective temperatures and viscosities

<sup>4</sup>This value was extrapolated from the radius values reported in supplier's data according to the power law  $R_h = 0.7734 M_w^{0.4735}$

En parallèle, nous avons également mesuré, et comparé aux valeurs théoriques issues de la loi de Stokes, les coefficients de diffusion de l'ensemble des solutés dans du perméat d'ultrafiltration, dont la

composition est similaire à celle de la phase aqueuse de notre fromage UF modèle (viscosité de 1.2 mPa.s à 20°C) (Figure 17). L'évolution des coefficients de diffusion expérimentaux en fonction de la masse moléculaire des solutés a pu être modélisée par une loi en puissance de la forme  $D = A.M_w^{-\alpha}$ , où  $A$  est une constante et  $\alpha$  est un exposant caractéristique. Ce type de relation est souvent proposé dans la littérature pour décrire la diffusion de macromolécules dans différents milieux, avec des valeurs de  $\alpha$  de l'ordre de 0.5 à 0.6 dans des solutions diluées (de Gennes, 1979), à 2.5 pour des systèmes concentrés (Tao et al., 2000). Dans notre cas, un bon ajustement de l'équation  $D = A.M_w^{-\alpha}$  a été obtenu, avec une valeur de  $\alpha$  relativement proche de 0.5. Cette relation est donc en accord avec la relation classique de Stokes-Einstein, mais aussi avec la loi de Flory décrivant la diffusion au hasard de macromolécules linéaires ou ramifiées dans un *bon solvant* à dilution infinie (Flory, 1953).

Enfin, la faible différence entre les coefficients de diffusion obtenus dans l'eau et dans le perméat d'UF pour l'ensemble des solutés étudiés était seulement due à la différence de viscosité entre les deux solutions (1 mPa.s pour l'eau contre 1.2 mPa.s pour le perméat). Ceci nous a permis de confirmer l'absence d'interaction entre les FITC-dextranes ou les protéines marquées et les solutés du perméat (lactose, minéraux, ...) et ainsi de valider le choix du modèle de Fick pour estimer les coefficients de diffusion effectifs à partir des données de FRAP.

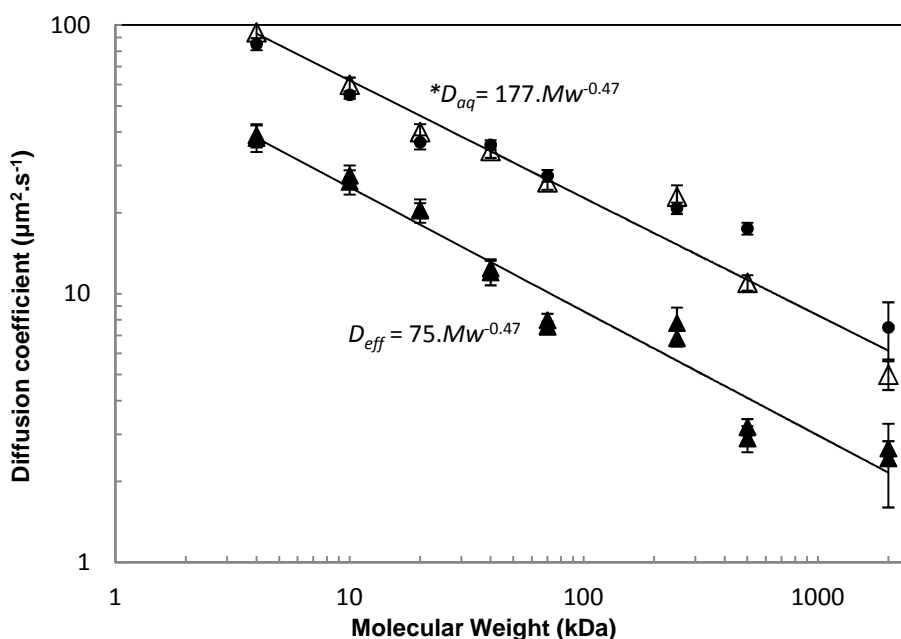


Figure 17. Représentation log-log des coefficients de diffusion des FITC-dextranes obtenus par la technique FRAP dans le fromage UF modèle (▲) et dans le perméat (△) en fonction de leurs masses moléculaires. Coefficients de diffusion théoriques des FITC-dextranes dans le perméat estimés grâce à l'équation de Stokes-Einstein en utilisant les rayons hydrodynamiques mesurés dans l'eau (●). \*régression obtenue sans tenir compte de la valeur de  $D_{aq}$  obtenue avec le FITC-D250.

## Diffusion des FITC-dextrans dans le fromage UF modèle

La figure 17 montre que les coefficients de diffusion effectifs des FITC-dextrans dans le fromage UF modèle obtenus grâce à la technique de FRAP suivaient exactement la même évolution en fonction de leur masse moléculaire (exposant caractéristique  $\alpha$  proche de 0.5), et donc de leur taille, qu'en solution aqueuse (i.e. la solution de perméat). La diminution des coefficients de diffusion avec l'augmentation de la masse moléculaire du soluté diffusant a déjà été observée dans quelques études publiées récemment sur la diffusion de différents solutés modèles dans divers gels laitiers (Balakrishnan et al, 2012; Colsenet, 2005; Le Feunteun, 2007). De plus, quelque soit la taille du soluté jusqu'à 25 nm de rayon hydrodynamique (FITC-D2000), les valeurs des coefficients de diffusion effectifs des FITC-dextrans dans le fromage modèle étaient plus faibles que dans la solution de perméat. Cette réduction est principalement due à l'encombrement stérique causé par le réseau protéique dans le fromage UF modèle.

D'après les régressions obtenues de la forme  $D = A.M_w^{-\alpha}$  avec  $\alpha = 0.47$  à la fois dans la solution aqueuse et dans le fromage UF modèle, nous avons pu en déduire que les coefficients de diffusion effectifs des dextrans dans le fromage UF modèle étaient proportionnels à leurs coefficients de diffusion respectifs dans la phase aqueuse, avec  $D_{eff}/D_{aq} = 0.42$ . Cette observation implique que dans notre fromage UF modèle, la diffusion des plus grands solutés n'était pas plus entravée par la structure de la matrice que celle des plus petits solutés.

On peut faire l'hypothèse que l'ensemble des macromolécules de FITC-dextrans ont donc pu diffuser à travers les pores de la matrice sans être contraints de se déformer. Pourtant, Payet et al. (2008) n'ont pas observé ce type de comportement lors de l'étude de la diffusion de FITC-dextrans dans une matrice de chitosane. Ils ont trouvé une valeur de  $\alpha$  proche de 1 pour les plus petits solutés (FITC-D4 et D70), et ils ont observé que la diffusion des plus grands solutés étudiés (~ 150 kDa) était fortement ralentie du fait de la réticulation du gel. Colsenet et al. (2006) ont quant à eux obtenu un  $\alpha$  compris entre 0.6 et 0.8 au cours de l'étude de la diffusion de PEG de différentes tailles (1 à 82 kDa) dans des gels de protéines sériques de concentrations variables (0.1 à 0.4 g/g). Ces valeurs de  $\alpha$  étant plus élevées que celle obtenue pour la diffusion de FITC-dextrans le fromage UF modèle, nous en avons déduit que cette matrice n'était pas suffisamment concentrée en protéines (0.16 g/g) pour induire une diffusion de type « reptationnel » chez les macromolécules flexibles de dextrans.

Cela signifie que,  **dans le cas de la migration de solutés tels que les dextrans, la théorie des effets d'obstruction liés à la présence du réseau protéique semble pouvoir s'appliquer à notre fromage UF modèle.** En effet, d'après la théorie de la diffusion dans des gels de polymères (Hermansson et al., 2006 ; Cai et al., 2011), le degré d'obstruction vis-à-vis de la diffusion dépend à la fois de la taille des pores du réseau et de la taille du soluté diffusant. Étant donné que l'ensemble des FITC-dextrans de 4 kDa à 2000 kDa diffuse de la même manière dans le fromage modèle, la taille des pores de cette matrice doit être plus grande que le diamètre maximal des solutés étudiés (diamètre de 50 nm pour le FITC-D2000). C'est pourquoi la mobilité des solutés dans la matrice est réduite d'un **facteur constant** par rapport à la diffusion en solution, dit « **facteur d'obstruction** », et **égal au ratio porosité/tortuosité ( $\epsilon/\tau$ ) de la matrice, ici égal à 0.42.** Des observations de cette matrice en microscopie électronique à transmission, réalisées récemment par C. Cauty, confirment d'ailleurs ce résultat (analyse des images en cours).

Pendant, il est très important de garder à l'esprit que **ce modèle présuppose que le réseau protéique est immobile**, et qu'il ne prend en compte ni les interactions soluté-matrice, ni les propriétés physico-chimiques des solutés, qui peuvent pourtant être importantes dans certains cas (Masaro et Zhu, 1999b; Matsukawa et Ando, 1997). Les FITC-dextrans étant des molécules non chargées, nous avons supposé que les phénomènes d'interactions de type électrostatiques étaient inexistantes entre ces solutés et le fromage UF modèle.



De plus, ce modèle d'obstruction sous-entend aussi **que les micelles de caséine forment des "obstacles" imperméables à la diffusion des solutés**. Or certains auteurs ayant étudié les phénomènes de diffusion dans des gels de caséines ne sont pas en accord avec cette hypothèse. Ainsi, Colsenet et al. (2005) et Le Feunteun et Mariette (2008) ont étudié l'effet de la concentration en caséines sur la diffusion de polyéthylène glycol (PEG) en solution ou dans des gels de caséines. Pour expliquer leurs résultats, ils ont présumé que la porosité interne des micelles de caséines était suffisamment importante pour que certains solutés (de tailles inférieures à cette porosité intra-micellaire) puissent diffuser à l'intérieur des micelles, et non pas seulement entre les « obstacles » formés par les micelles de caséines. Les articles de McMahan et Oomen (2008) et Bouchoux et al (2010) corroborent largement cette hypothèse puisqu'ils montrent que les micelles de caséines sont de véritables « éponges », et donc des matériaux poreux largement perméables aux molécules (Le Feunteun, 2007).

Du fait que la diffusion de l'ensemble des FITC-dextrans sur une large gamme de masses moléculaires (4 kDa à 2000 kDa) suivait un comportement similaire dans le fromage UF modèle, nous avons fait l'hypothèse que les phénomènes de diffusion de ces solutés à travers les micelles de caséine pouvaient être négligés. En effet, des polymères comme les dextrans sont déformables et peuvent donc changer de forme en fonction de leur environnement (de Gennes, 1971 et 1979). Par conséquent, même si les macromolécules de dextrans étaient en mesure de diffuser à travers les micelles de caséines, nous avons présumé qu'ils pouvaient en sortir très rapidement grâce à leur capacité de déformation. Ainsi, les effets d'obstruction au transfert des dextrans dans le fromage UF modèle ont pu être reliés aux deux paramètres structuraux de porosité et de tortuosité du réseau protéique seulement, avec  $\varepsilon/\tau \sim 0.42$ .

### **Diffusion des protéines**

Afin d'étudier l'influence de différentes caractéristiques physico-chimiques des solutés (taille, forme et charge) sur la diffusion dans le fromage UF modèle, nous avons mesuré les coefficients de diffusion effectifs de trois protéines marquées au FITC ( $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG et BSA) par la technique de FRAP. Comme le montre la Figure 18, une forte diminution des coefficients de diffusion effectifs des protéines a été observée par rapport aux dextrans de rayons hydrodynamiques voisins. La diffusion de ces solutés, protéines de conformation globulaires, rigides et chargées, étant plus restreinte que celle de macromolécules flexibles et neutres telles que les dextrans dans le fromage UF modèle, l'existence d'interactions stériques et/ou électrostatiques entre la matrice et les protéines nous a semblé l'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène.

Les points isoélectriques de la  $\alpha$ -LA, la  $\beta$ -LG et de la BSA sont respectivement de 4.8, 5.3 et 5.1 (Kinsella et Whitehead, 1989). Ces protéines sont donc chargées négativement au pH de la matrice (pH 6,6). Au même pH, la charge globale des micelles de caséine formant le réseau protéique du fromage UF modèle est également négative, ce qui limite les forces d'attraction électrostatiques entre les solutés diffusants et la matrice. Par conséquent, en supposant que celles-ci étaient négligeables, il semblerait qu'**au-delà de la taille des solutés diffusants et des propriétés structurales de la matrice, la forme des protéines ait également un impact crucial sur leur coefficient de diffusion effectif dans une matrice complexe comme le fromage**.

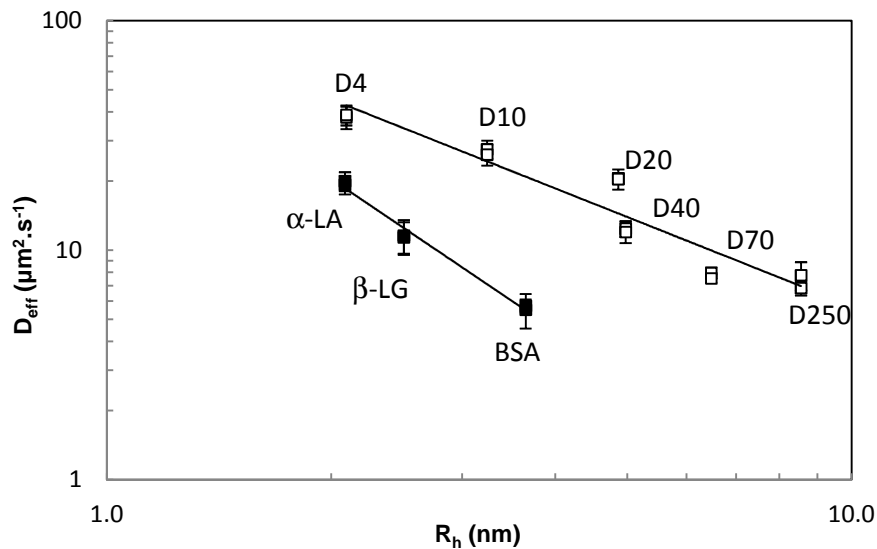


Figure 18. Représentation log-log des coefficients de diffusion expérimentaux des FITC-dextrans (□) et des protéines marquées au FITC (■) dans le fromage UF modèle en fonction de leurs rayons hydrodynamiques respectifs ( $R_h$ ).

D'après les travaux de Griffiths et al. (1995), Pluen et al. (1999) ou Seiffert et Oppermann (2008) sur la diffusion de macromolécules dans des gels poreux, des solutés sphériques et rigides subissent des forces de résistance au transfert plus importantes que des solutés linéaires et flexibles. A l'instar de la théorie évoquée dans le paragraphe précédent, nous avons émis l'hypothèse que les protéines pourraient également diffuser à travers les micelles de caséines du fromage UF modèle, qui sont connues pour être relativement poreuses. Les valeurs des coefficients de diffusion de ces protéines rigides seraient donc inférieures à celles des solutés flexibles (dextrans) de rayons hydrodynamiques comparables parce que les protéines sont susceptibles de rester « piégées » plus longtemps dans les pores des micelles de caséines que des macromolécules déformables comme les dextrans.

**Par conséquent, le modèle d'obstruction, qui ne permet pas de tenir compte des interactions solutés-matrice, ne peut pas s'appliquer à la description de la diffusion de solutés rigides comme les protéines globulaires étudiées ici.** Outre leur taille, la forme des solutés semble donc être un paramètre important à prendre en compte pour caractériser leur capacité de diffusion dans une matrice complexe comme le fromage.

## Conclusion

Cette technique FRAP offre des perspectives très prometteuses dans la caractérisation de la diffusion moléculaire *in situ* dans des milieux complexes, et notamment les produits alimentaires. **Nous avons pu mettre en évidence que des solutés de très grand poids moléculaires, jusqu'à 2 MDa, étaient capables de diffuser dans le fromage UF modèle.** Certes les coefficients de diffusion effectifs des plus grands solutés étaient plus faibles que ceux des petits puisqu'inversement proportionnels à leur rayon, mais **nous n'avons pas observé d'effet d'obstruction supplémentaire lié à la microstructure du réseau protéique.** De plus, nous avons pu mettre en évidence par cette technique FRAP que **la forme du soluté diffusant avait une importance significative sur leur mobilité dans la matrice.**

**L'ensemble des résultats de cette étude ont profondément interpellé les microbiologistes de mon équipe puisqu'ils signifient que des substrats de très grande taille, et les enzymes (endogènes, exogènes ou libérées après la lyse des cellules microbiennes) sont sans doute parfaitement capables de migrer dans un fromage.** Reste à déterminer si les vitesses de diffusion de ces substrats sont limitantes pour les réactions enzymatiques !

## Distribution spatiale des colonies bactériennes

### Publication N°15

Ce projet a été mené principalement par S. Jeanson, en collaboration avec J. Chadoeuf pour la partie modélisation.

Nous avons vu en introduction que la compréhension des mécanismes de l'affinage au niveau microscopique implique notamment d'avoir une vision spatiale de la distribution des colonies bactériennes (taille et distance entre elles) au sein de la matrice, et par conséquent, de connaître la surface d'échange entre les colonies et la matrice fromagère. En effet, nous considérons les colonies bactériennes comme les principaux réacteurs de l'affinage. De nombreuses visualisations de colonies en microscopie (optique ou électronique) existent dans la littérature mais aucun article ne relate leur distribution spatiale, en fonction notamment du niveau d'ensemencement. Acquérir cette vision spatiale nous a paru être un préalable essentiel.

A cette fin, nous avons opté pour la stratégie suivante : (i) modéliser la distance théorique entre les colonies en fonction du niveau d'ensemencement initial de la matrice en microorganismes, (ii) valider expérimentalement la théorie développée à l'aide d'observations de colonies immobilisées dans le fromage UF modèle. Pour pouvoir observer *in situ* les colonies microbiennes immobilisées dans cette matrice opaque en microscopie confocale, nous avons choisi une souche mutante de *L. lactis* exprimant constitutivement le gène de la « green fluorescent protein » (GFP). Afin d'obtenir des colonies de tailles variables, nous avons fait varier le taux d'ensemencement de cette souche fluorescente dans la matrice de  $10^5$  à  $10^7$  ufc/g.

Les principales conclusions de cette étude ont été que :

- (i) La **distribution des colonies bactériennes était aléatoire (distribution de Poisson)** dans le fromage UF modèle, et cela quel que soit le taux d'ensemencement, de  $10^5$  et  $10^7$  ufc/g. Les valeurs théoriques estimées de densité de colonies et des distances entre colonies étaient comparables aux valeurs expérimentales. Toutes les cellulesensemencées ont donc donné lieu à la formation d'une colonie.
- (ii) **La taille des colonies et la distance expérimentale entre les colonies ont diminué quand le taux d'ensemencement était augmenté** (Figure 19). En conséquence, l'aire interfaciale, surface d'échange entre les colonies bactériennes et la matrice, à biomasse finale égale par unité de volume, a augmenté significativement avec le taux d'ensemencement. Par exemple, elle a augmenté d'un facteur 7 quand l'ensemencement était augmenté d'un facteur 50.

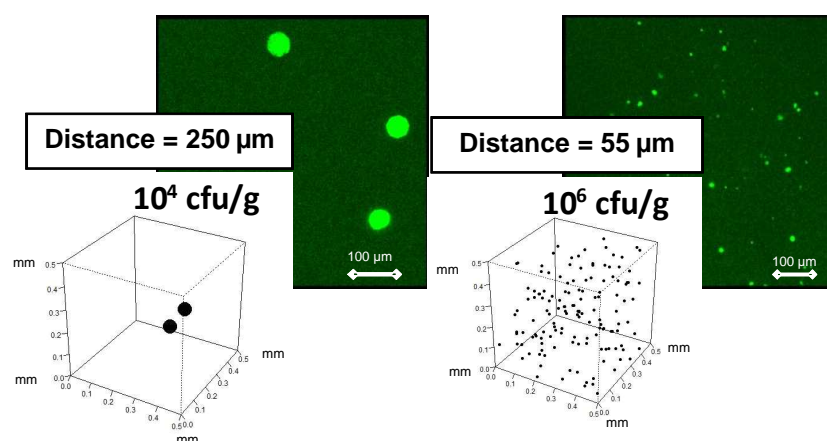


Figure 19. Distribution spatiale théorique et expérimentale (microscopie confocale) de colonies bactériennes (souche de *L. lactis* GF, en vert), ensemencées à  $10^4$  et  $10^6$  ufc/g dans le fromage UF modèle.

En conclusion, il apparait donc que **la distribution spatiale des colonies conditionne leur taille, et donc, l'aire interfaciale totale de bactéries directement au contact de la matrice fromagère**. Nous pensons que cette notion d'interface bactérie/matrice est primordiale pour le déroulement de l'affinage d'un fromage, et notamment par son **impact sur les cinétiques enzymatiques** : soit directement, en modulant l'étendue de l'interface où sont localisées les enzymes microbiennes, soit indirectement, en modifiant la physiologie des cellules à l'intérieur de la colonie, physiologie qui peut dépendre de la taille de celle-ci et/ou du micro-environnement associé. **La connaissance des phénomènes de migration des solutés au sein de la matrice, voire au sein même des colonies microbiennes, s'avère donc indispensable pour comprendre l'interaction bactérie /matrice.**

## Les colonies et leur micro-environnement

### Publication N°19

L'influence de l'aire interfaciale n'a de sens que si la colonie bactérienne se comporte en « bulle » imperméable, et non en « éponge ». **Autrement dit, est ce que les solutés et produits diffusent au sein des colonies ? Si oui, imposent-elles, par leur structure et leurs propriétés, une limite diffusionnelle (notion de « porosité » des colonies ?) ?**

**En effet, si de telles limites diffusionnelles existent, elles peuvent générer autour des colonies des micro-gradients de concentration qui peuvent modifier l'activité métabolique des cellules microbiennes, et donc la cinétique de l'affinage.** Comprendre l'affinage à l'échelle de la colonie nécessite d'explorer leur micro-environnement, et notamment, l'interface entre la colonie et la matrice (gradients de pH, hydrophobicité, charge...).

Sophie Jeanson et moi-même avons caractérisé les micro-gradients de pH et la porosité des colonies bactériennes immobilisées dans le fromage UF modèle dans le cadre d'un Appel d'Offre Incitatif CEPIA-MICA INRA, le **Projet EXECO (EXploration du microEnvironnement des COLonies bactériennes en matrice laitière, 20 k€)** que nous avons obtenu en 2011.

Au niveau international, la croissance bactérienne en colonies a fait l'objet de quelques publications mais seuls des milieux transparents et non alimentaires (gélatine et agar) ont été utilisés dans ces travaux, issus de quatre équipes européennes uniquement (Brocklehurst et al., 1995; Skandamis et al., 2007; Theys et al., 2009; Wimpenny et al., 1995). **Cependant l'interaction entre la colonie bactérienne et son micro-environnement n'a jamais été étudié.** Seuls les micro-gradients de pH en gélatine ont été étudiés en fonction de la taille et de la distance entre colonies (Malakar et al., 2000). En outre, les **propriétés de surface des colonies bactériennes n'ont jamais été étudiées dans des matrices alimentaires** alors qu'elles sont cruciales pour comprendre les interactions entre les colonies bactériennes et la matrice. **Enfin, aucune étude portant sur la diffusion de solutés au sein des colonies bactériennes du fromage n'a été reportée dans la littérature.**

Ma collègue S. Jeanson a mesuré le pH local *in situ* autour de colonies de lactocoques immobilisées dans le fromage UF modèle, en utilisant un traceur fluorescent sensible au pH (SNARF<sup>®</sup> 4F). Nous avons ainsi observé en microscopie confocale que l'acide lactique ne s'accumulait pas autour de colonies de façon durable et **qu'aucun micro-gradient de pH n'était détectable par cette technique**, et ce à plusieurs taux d'inoculation en lactocoques différents. Les résultats de cette étude ont fait l'objet de deux présentations orales dans des congrès internationaux (n°34 et 42) et sont en cours de valorisation dans une publication (n°22).

Concernant l'étude de la « porosité » des colonies immobilisées en matrice fromagère, face à l'absence de références dans le domaine de la microbiologie laitière ou alimentaire, j'ai choisi d'orienter ma recherche bibliographique vers le domaine des biofilms. En effet, selon moi, ces systèmes microbiens dans lesquels les microorganismes se développent sous forme d'amas de cellules semblaient se rapprocher le plus des conditions de croissance des microorganismes en matrices laitières. De nombreuses études portant sur la diffusion au sein de biofilms et d'agrégats de microorganismes de compositions variées ont été reportées, avec entre autres les articles de Christensen and Characklis (1990), Libicki et al. (1988), Siegrist and Guyer (1985), de Beer et al. (1997), Stewart (1998), et plus récemment ceux de l'équipe de R. Briandet : Bryers and Drummond (1998), Briandet et al. (2008), Guiot et al. (2002), Lacroix-Gueu et al. (2005), Waharte et al. (2010), Habimana et al. (2011). Il est important de remarquer que la plupart de ces études concernait en fait la mesure des coefficients de diffusion des

solutés au sein de la structure globale du biofilm, comprenant donc la matrice polysaccharidique plus les colonies microbiennes, plutôt que dans les amas de cellules seulement. Outre le fait que les ordres de grandeur des valeurs obtenues étaient très « équipe-dépendants », les coefficients de diffusion dépendaient principalement de la taille du soluté, de sa charge et de la structure du réseau d'exopolysaccharides qui entourait les cellules, fonction de la souche bactérienne étudiée (deBeer et al., 1997; Takenaka et al., 2009). Je me suis également rapidement rendu compte qu'il allait être très difficile d'extrapoler les conclusions obtenues dans les biofilms aux matrices fromagères. En effet, l'environnement dans lequel les colonies microbiennes sont piégées dans le fromage est tout à fait différent de celui des biofilms : dans le fromage, les colonies sont dispersées dans un réseau lipoprotéique plutôt solide alors que dans un biofilm, les amas de cellules sont immergés dans une suspension liquide d'exo-polysaccharides.

**L'objectif de ce projet a donc été de déterminer si des solutés sont capables de migrer au travers de colonies bactériennes immobilisées dans différentes matrices fromagères modèles, et si oui jusqu'à quelle taille de soluté ?**

Après discussion avec nos collègues du STLO, spécialistes des interfaces biochimiques, nous avons avec S. Jeanson, développé un protocole pour tester cette hypothèse. Les dextrans de différentes tailles (4 à 150 kDa), comme ceux qui avaient été utilisés pour développer la technique de FRAP (Publications N°17 et 20), pouvaient-ils diffuser dans des colonies de *L. lactis* subsp. *lactis* LD61 immobilisées dans une matrice solide? Nous avons choisi de tester deux types de gels, le fromage UF modèle ainsi qu'un milieu encore plus simple, à base d'agarose et d'éléments nutritifs (M17). En effet, les gels d'agarose sont souvent utilisés dans la littérature pour simuler des aliments fermentés. Nous voulions ainsi comparer le comportement des colonies microbiennes dans ces deux types de produit et voir si l'agarose pouvait réellement être utilisé comme modèle représentatif d'un produit alimentaire fermenté.

L'utilisation de dextrans marqués par la rhodamine (RITC) plutôt que par la fluorescéine (FITC) s'est avérée plus appropriée dans le cadre de cette étude. En effet, contrairement à la fluorescéine, la rhodamine est peu sensible au pH, ce qui permet de limiter la perte de fluorescence lors de l'acidification de la matrice par les bactéries lactiques. De plus, la rhodamine étant repérée dans le rouge au microscope confocal, nous avons pu co-localiser dans la matrice les cellules microbiennes par un marquage simultané avec la sonde SYTO<sup>®</sup> 9<sup>™</sup> (Molecular Probes, Invitrogen), repérée dans le vert au microscope.

## **Principaux résultats**

Les observations microscopiques des colonies de *L.lactis* après 24h de croissance à 30°C ont révélé une différence notable de forme selon le milieu d'immobilisation des cellules. Alors que les colonies étaient plutôt lenticulaires dans l'agarose, elles étaient parfaitement sphériques dans le fromage UF modèle. La forme lenticulaire des colonies de *L.lactis* immobilisées en gel d'agarose déjà été observée et expliquée dans la littérature (Mitchell et Wimpenny, 1997 ; Kabanova et al., 2012). Cette forme lenticulaire est probablement due au fait que les liaisons formées entre les hélices d'agarose au cours de la gélification ne sont pas symétriques, et donc que les contraintes exercées par le gel sur les colonies en croissance ne sont pas homogènes. A l'inverse, le fromage UF modèle formant un réseau protéique très homogène et isotrope, nous avons supposé que les contraintes exercées par les protéines sur les colonies étaient également isotropes, entraînant une croissance homogène dans toutes les directions de l'espace et donc la formation de colonies sphériques. Saboya (2002) avait d'ailleurs déjà montré par microscopie électronique à balayage une homogénéité quasi parfaite du réseau protéique des fromages UF par

rapport aux fromages traditionnels. Fait intéressant, nous avons remarqué qu'en ajoutant de la matière grasse au fromage UF modèle, les colonies de lactocoques ne se développaient plus sous forme de sphère, mais adoptaient des géométries non définies et semblaient se placer de préférence à proximité de la matière grasse. La matière grasse entraîne donc probablement des perturbations dans le réseau qui conduisent à l'application de contraintes anisotropes sur les colonies, ou peut être à des affinités spécifiques avec les bactéries (Laloy et al., 1996, Lopez et al., 2006).

Afin d'observer la répartition des protéines laitières dans le fromage UF modèle, et notamment au sein des colonies de lactocoques, nous avons coloré spécifiquement les protéines avec du bleu de Nile. Nous avons observé une absence totale de fluorescence dans la colonie, même entre les cellules. Deux hypothèses peuvent permettre expliquer ce résultat : soit les cellules repoussent le réseau protéique de caséines en se multipliant, soit elles ont totalement consommé les caséines présentes autour d'elles au fur et à mesure de la croissance de la colonie. L'espace entre les cellules de lactocoques dans une colonie est donc finalement probablement occupé seulement par la phase aqueuse du rétentat d'UF, composée d'eau, de minéraux et des produits du métabolisme (acide lactique, peptides, acides aminés...).

Pour déterminer si les RITC-dextrans de différentes tailles (4, 70 et 155 kDa) étaient capables de migrer au sein des colonies, une solution de dextrans a été déposée à la surface d'un gel cassette<sup>®</sup> à 20° C contenant la matrice gélifiée (fromage UF modèle ou agarose). Les colonies de *L. lactis* LD61 avaient été préalablement immobilisées dans ces deux matrices. Après 3 et 6 h de migration, les gels étaient directement observés en microscopie confocale (Figure 20). En parallèle, les profils d'intensité de fluorescence relative dans la colonie par rapport au milieu environnant ont été quantifiés.

Les observations nous ont permis de montrer que les colonies de lactocoques immobilisées dans l'agarose ou dans le fromage UF modèles étaient poreuses vis-à-vis des dextrans puisque l'ensemble des RITC-dextrans considérés, de tailles comprises entre 4 et 155 kDa, ont été capables de pénétrer à l'intérieur des colonies de *L. lactis*. Cependant, la cinétique de migration des dextrans à l'intérieur des colonies dépendait du milieu d'immobilisation des bactéries. En effet, trois heures après le dépôt des solutés à la surface du milieu modèle, l'intensité de fluorescence des dextrans de plus haut poids moléculaire (70 et 155 kDa) à l'intérieur des colonies était trois fois plus élevée dans le fromage UF modèle que dans le gel d'agarose, alors qu'elle atteignait le même niveau dans les deux milieux après 6 heures de diffusion (figures 20 et 21).



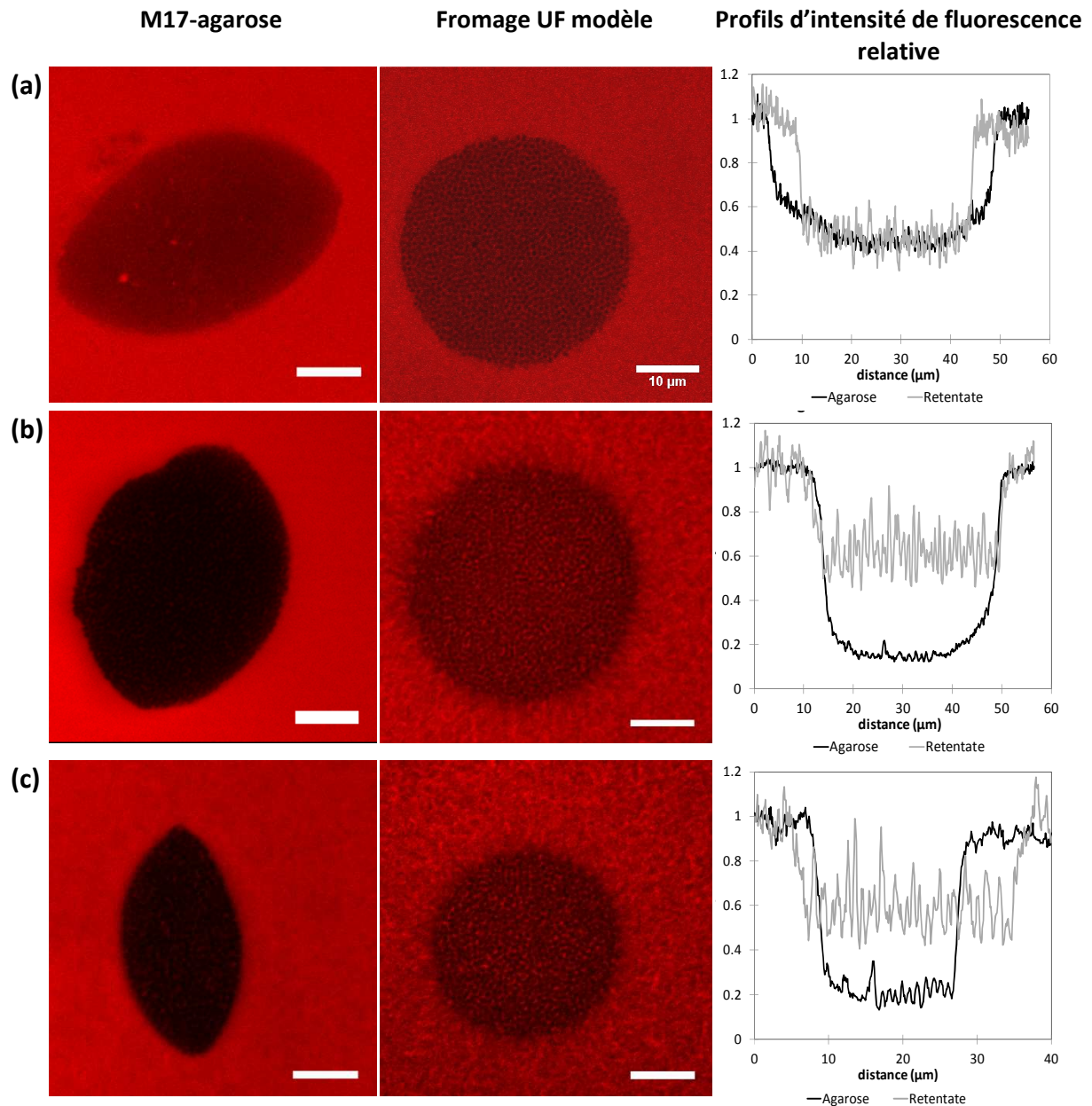
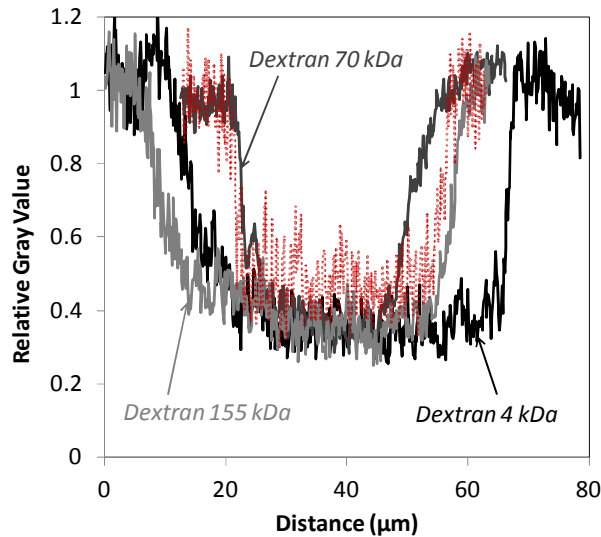


Figure 20. Observations au microscope confocal des molécules de RITC-dextrans à l'intérieur des colonies de *L. lactis* immobilisées dans l'agarose-M17 et le fromage UF modèle après 3 heures de migration à 20°C. A droite, représentations graphique des profils radiaux d'intensités de fluorescence relative correspondants. (a) RITC-dextran 4.4 kDa, (b) RITC-Dextran 70 kDa et (c) RITC-Dextran 155 kDa. Barre d'échelle = 10 µm.



..... RITC-Dextran 4kDa in UF-cheese after 24h of diffusion

Figure 21. Profils d'intensité relative de fluorescence typiques obtenus lors de l'observation en microscopie confocale de colonies de *L. lactis* immobilisées en gel d'agarose 6 h après le dépôt des solutés RITC-dextrans 4, 70 et 155 kDa à la surface des gels.

La courbe rouge correspond au profil typique d'intensité de fluorescence du RITC-dextran 4 kDa à l'intérieur de colonies immobilisées dans le fromage UF modèle après 24 h à 20°C.

Pour expliquer cette différence, nous avons émis deux hypothèses :

- (i) soit la cinétique de migration des dextrans à l'intérieur des colonies est différente, du fait d'une différence de densité cellulaire des colonies par exemple,
- (ii) soit la composition ou l'organisation de l'interface entre les bactéries et la matrice environnantes sont différents dans les deux milieux.

Pour évaluer la densité des cellules dans une colonie, et avoir une idée du « tassement » de celles-ci selon le milieu d'immobilisation, j'ai compté le nombre de cellules fluorescentes visibles dans un plan focal (2D) sur un ensemble de colonies immobilisées, soit en fromage UF modèle, soit en agarose. Ce comptage ne m'a pas permis de révéler de différence significative au niveau de la densité cellulaire entre les deux milieux ( $0.7 \pm 0.2$  cellules/ $\mu\text{m}^2$ ). Des observations à plus petite échelle, en utilisant la microscopie électronique à transmission, sont actuellement en cours (C. Cauty) afin d'explorer plus précisément l'espace entre les cellules bactériennes, ainsi que l'interface entre les colonies de lactocoques et la matrice.

Dans tous les cas, le fait que **des solutés de taille aussi élevée que les dextrans 155 kDa peuvent pénétrer à l'intérieur des colonies immobilisées dans une matrice solide comme le fromage UF modèle** remet en cause l'existence d'une éventuelle restriction de l'activité métabolique des bactéries par des phénomènes de limitation diffusionnelle. **En effet, cette étude nous conduit à réfuter l'hypothèse selon laquelle l'interface colonie/matrice serait plutôt de type « bulle » pour privilégier le modèle de type « éponge », au sein duquel des molécules comme des enzymes ou des substrats de grandes dimensions peuvent diffuser.**

Cependant, les vitesses de pénétration des dextrans doivent être quantifiés plus précisément afin d'évaluer dans quelle mesure la cinétique de pénétration de ces solutés modèles dépend de leur taille. **En outre, ces conclusions sont à confirmer en élargissant cette étude à d'autres solutés plus représentatifs**

**des substrats et métabolites réels que les molécules de dextrans, et également à d'autres souches bactériennes, ayant des propriétés de surface différentes.**

Il reste aussi à explorer l'impact de la composition de la matrice, notamment en ajoutant de la matière grasse, sur cette porosité, pour bien comprendre les interactions entre les bactéries et la microstructure des fromages. Ces conclusions sont très importantes pour appréhender le métabolisme bactérien dans le fromage puisque qu'elles laissent à penser que l'accès aux nutriments ne serait pas limité, et que les produits du métabolisme ne s'accumuleraient pas dans la colonie, contrairement à ce qui avait été montré avec de grosses colonies ayant poussé à la surface d'un milieu de culture (McKay et al., 1997; Walker et al., 1997).

## 4. BILAN ET PERSPECTIVES

### 4.1. Bilan

Les travaux et démarches de recherche présentés dans ce document de synthèse sont axés sur l'étude de deux procédés alimentaires, l'homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions et l'affinage des fromages. L'objectif poursuivi est une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans l'évolution physico-chimique et microstructurale de ces matrices complexes. Compte tenu de la diversité des phénomènes mis en œuvre au cours du procédé d'homogénéisation et du processus d'affinage, et de leur interdépendance, il m'a semblé indispensable d'adopter une démarche pluridisciplinaire permettant d'analyser le comportement des émulsions ou des matrices fromagères en associant les aspects de transferts (matière ou mouvement), de physico-chimie, de microbiologie et de microstructure. Cette volonté de pluridisciplinarité m'a amené à développer et à coordonner des collaborations avec différents chercheurs, chacun d'entre eux apportant ses compétences et sa vision propre des phénomènes. Ceci explique en grande partie la diversité et la complémentarité des approches adoptées (expérimentale, modélisation, simulation).

Le bilan de mes activités de recherche réalisées au STLO au sein de l'équipe « Dynamiques Diffusionnelles et Réactionnelles dans les matrices laitières » souligne la complexité de la structure des fromages et des phénomènes microbiologiques et biochimiques mis en jeu au cours du processus d'affinage. Cette grande complexité nous a amené à travailler sur des matrices modèles plutôt que sur des fromages réels, en simplifiant la composition des produits et en utilisant ou non des microorganismes. Ceux-ci sont d'ailleurs considérés plus comme des outils permettant de répondre à une question de recherche que comme seuls objets d'étude. L'originalité majeure de notre stratégie de recherche a consisté à développer un maximum d'outils expérimentaux, transférés pour la plupart d'autres domaines scientifiques, basés sur une approche non destructive et sur l'observation et la quantification des phénomènes à l'échelle microscopique.

Pour résumer, dans un fromage, les bactéries se développent en colonies créant ainsi des concentrations d'enzymes et donc des réactions enzymatiques/métaboliques en des points que l'on peut considérer comme les « points chauds » de l'affinage. Les phénomènes réactionnels et diffusionnels nécessaires à l'affinage se produisent, de fait, autour des colonies bactériennes. Nos premiers résultats ont montré que la distribution spatiale des colonies conditionne leur taille, et donc, l'aire interfaciale avec la matrice fromagère. Notre hypothèse de travail est que cette distribution de taille peut moduler les cinétiques d'affinage : soit directement, en modulant l'étendue de l'interface où sont localisées les enzymes, soit indirectement, en modifiant la physiologie des cellules à l'intérieur de la colonie, physiologie qui peut dépendre de la taille de celle-ci et/ou du micro-environnement associé. Nous avons vu également que la connaissance en parallèle des phénomènes de migration des solutés (substrats et produits des réactions enzymatiques) au sein de la matrice, voire même au sein des colonies bactériennes, s'avère indispensable pour comprendre les interactions bactéries/matrices, et représente un des verrous majeurs dans la modélisation des réactions enzymatiques ayant lieu au cours de l'affinage.

## 4.2. Projet de recherche

**Au cours des années à venir, je compte orienter mes travaux de recherche principalement autour de deux axes majeurs. Le premier axe, que je porte intégralement, concerne la dynamique des solutés en fonction de la microstructure des matrices.** Ce projet de recherche se situe dans la continuité de mes travaux initiés depuis 2005 au STLO, en s'orientant vers une modélisation plus poussée des phénomènes de migration de solutés en matrice complexe.

**Le deuxième axe, sur lequel je compte m'investir plus particulièrement dans le futur, concerne la modélisation de l'action des enzymes protéolytiques immobilisées en matrice fromagère.** Pour cela, nous avons démarré récemment (octobre 2012) une collaboration avec S. Gaucel (UMR GMPA, INRA Grignon), ingénieur de recherche expert en modélisation mathématique spatio-temporelle de systèmes biologiques complexes. Ma collègue biochimiste, V. Gagnaire, m'accompagnera dans cette démarche en apportant ses compétences acquises au cours des 15 dernières années au sujet de la protéolyse des fromages. En effet, maintenant que nous avons une idée relativement précise des propriétés de migration de solutés en fonction de leur taille et de leur conformation en matrice fromagère (certes modèle pour l'instant), il nous paraît désormais prioritaire de déterminer quels sont les facteurs limitants de l'activité métabolique des bactéries immobilisées (diffusionnel, réactionnel, phénomènes de partage, ...) pour compléter notre compréhension des mécanismes d'affinage.

### 4.2.1. Dynamique des solutés et microstructure des matrices laitières

En science des matériaux ou bien en science des sols, de nombreuses équipes de recherche tentent actuellement de formaliser le lien entre la structure du milieu et les phénomènes de diffusion. A fortiori, dans le domaine de la technologie fromagère, ce lien n'a encore été que très rarement étudié car il est extrêmement difficile à établir (Le Feunten, 2007). Quel que soit le milieu considéré (sol, emballage, fromage...), des questions fondamentales, comme la détermination des contributions de différents niveaux d'échelle aux phénomènes et propriétés structurales étudiées, ou comme la compréhension des évolutions dynamiques des structures, restent ouvertes. **En effet, comment prendre en compte, outre les difficultés liées à l'hétérogénéité très importante d'une matrice fromagère, l'évolution temporelle de sa structure interne liée aux activités métaboliques des micro-organismes et cataboliques des enzymes, qui entraînent une modification continue de la composition et de la structure associée du réseau lipoprotéique ?**

Jusqu'à présent, nous avons mis l'accent sur le développement de méthodes et d'outils de caractérisation des phénomènes de diffusion à l'échelle microscopique des solutés migrants. Ces propriétés de transfert sont incontournables car elles constituent des paramètres d'entrée indispensables pour l'étape de modélisation mathématique ultérieure des relations composition/structure de la matrice et transferts de solutés. Pour le moment, les propriétés structurales de la matrice restent essentiellement des éléments de compréhension de la texture du produit obtenu. En effet, le problème majeur réside dans la difficulté de relier des paramètres structuraux obtenus à différentes échelles d'observation aux coefficients de diffusion mesurés.

Pour modéliser la diffusion des solutés à l'échelle microscopique, nous avons adapté pour la première fois la technique de FRAP à une matrice fromagère modèle en utilisant des molécules fluorescentes commerciales de taille bien connue (FITC-dextrans 4 à 2000 kDa) ou des protéines marquées. **Cependant, le lien théorique entre la diffusion moléculaire, les caractéristiques physico-**

**chimiques des solutés et la structure des matrices est encore loin d'être véritablement formalisé et de nombreuses questions restent encore sans réponse :**

- ✚ Quels sont les facteurs clés de la migration de ces solutés ? S'agit-il des interactions matrice/solutés dans le cas de molécules chargées ? S'agit-il de contraintes stériques liées à la fois à la taille du soluté et à la microstructure du réseau lipoprotéique ?
- ✚ Quels sont les paramètres physiques qui permettraient de formaliser l'influence de la composition de la matrice sur la microstructure du réseau ? Comment les déterminer expérimentalement, à quelle échelle ?
- ✚ En outre, comment prendre en compte l'évolution spatio-temporelle de cette microstructure au cours du processus d'affinage de la matrice, liée d'une part à la réorganisation des micelles de caséines au cours du temps, et d'autre part à la transformation enzymatique des protéines et de la matière grasse au cours de la protéolyse et de la lipolyse ?

**Dans le cadre de la thèse de Juliana Valle** (octobre 2011 – octobre 2014), et maintenant que la technique de FRAP est opérationnelle sur une matrice de type fromage, **nous avons pour objectif à court terme de compléter la mesure des coefficients de diffusion de différents solutés de taille, charge et conformation variables sur des matrices de structures très différentes, en complexifiant progressivement la composition du milieu** afin de se rapprocher progressivement d'un fromage réel. En effet, selon la taille de la zone photoblanchie lors d'une expérience de FRAP, il est possible d'envisager de moduler l'échelle d'observation de la redistribution de fluorescence et ainsi de tenir compte de l'hétérogénéité du milieu (Loren et al, 2009).

Au niveau des développements méthodologiques, j'ai en projet de développer, en collaboration avec M. Tramier et S. Huet de la Plateforme de Microscopie de Villejean, **l'analyse des propriétés de migration des solutés dans nos matrices fromagères modèles par une autre méthode biophysique**, non invasive et basée sur la microscopie confocale : la **Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence ou FCS**. Cette technique présente l'avantage par rapport à la FRAP, qui présuppose un phénomène de diffusion pure des solutés, de mettre en évidence et de quantifier l'existence d'éventuelles interactions entre les solutés et la matrice. Contrairement aux autres techniques de fluorescence, ce n'est pas l'étude de l'intensité de la fluorescence émise par les molécules d'intérêt qui est réalisée par FCS, mais l'étude des fluctuations d'intensité à l'état d'équilibre. La FCS permet de déterminer de nombreux paramètres physiques, tels que les concentrations locales, les coefficients de diffusion et les constantes de réaction faisant intervenir des molécules fluorescentes. Les mesures peuvent être réalisées à très faibles concentrations, dans des conditions d'équilibre thermodynamique local. Dans une expérience standard de FCS sont détectées les fluctuations spontanées de fluorescence provenant d'un volume d'observation de l'ordre du femtolitre défini par le montage optique confocal, avec une très bonne résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de nanosecondes. À partir de l'étude de l'auto-corrélation temporelle des fluctuations de fluorescence, un temps de diffusion à travers un volume d'observation peut être calculé.

## **Choix des matrices modèles**

Afin de caractériser l'effet de la microstructure du réseau sur la diffusion des molécules, **nous modulerons la matrice fromagère modèle au niveau de sa composition et/ou de la technologie** (qui peut jouer sur sa structure). **Cela suppose en parallèle un développement méthodologique important au niveau de la caractérisation microstructurale des matrices et de la détermination de paramètres structuraux pertinents** afin de pouvoir formaliser le lien structure/propriétés de migration des solutés.

Pour modifier la structure du réseau (lipo)protéique, différents leviers technologiques ou de composition de la matrice modèle sont envisagés. Ainsi, il est possible de modifier la taille des pores du réseau de caséines en jouant non seulement sur la concentration en protéines, mais également en modifiant l'état de minéralisation des micelles de caséines en agissant sur les cinétiques de coagulation. Par exemple, si l'emprésurage a lieu après acidification jusqu'à pH 4.6, par action des bactéries lactiques ou de glucono delta-lactone (GDL), on obtiendra un réseau de type pâte molle, alors que si l'emprésurage a lieu à un pH plus élevé de l'ordre de 5.2, on obtient un réseau de type pâte pressée. Nous pourrions également observer l'effet de la matière grasse et des caractéristiques des globules gras (natifs ou modifiés par homogénéisation), de la présence ou non dans le réseau caséique de protéines sériques dénaturées par un traitement thermique, sur les propriétés de migration des marqueurs fluorescents dans les matrices.

En effet, comme précisé dans la partie bilan, nous avons mis au point, en 2008, une matrice modèle sur le principe de la technologie MMV basée sur une coagulation présure de rétentat d'ultrafiltration. L'ultrafiltration est un procédé membranaire permettant une rétention totale des protéines du lait, composé des caséines et des protéines sériques dans un rapport 4/1. Ces matrices de rétentat UF constituées de caséines, mais aussi de l'ensemble des protéines sériques, dénaturées à hauteur de 80% par le traitement thermique, ont une structure finalement assez éloignée d'un réseau protéique vraiment représentatif de celui d'un fromage traditionnel. En effet, lors d'une technologie fromagère traditionnelle, l'égouttage du lactosérum entraîne un drainage important des protéines sériques dissoutes dans la phase aqueuse du caillé. Nous en avons déduit, après discussion avec nos spécialistes de technologie fromagère, qu'une matrice à base de concentré de caséines pures serait, d'une part plus proche du réseau protéique d'un fromage réel, et surtout plus adaptée à notre objectif de formalisation des relations structure/propriétés de transfert. En effet, il apparaît plus facile de moduler de manière contrôlée la composition de cette matrice « de base » constituée principalement des micelles de caséines et de la phase aqueuse du lait (lactose, minéraux). Nous avons développé le procédé de fabrication de cette matrice, concentré de caséines natives de lait écrémé, avec l'aide de la Plateforme de Technologie Laitière de l'UMR. Il est basé sur une mise en cascade d'étapes de microfiltration tangentielle et de diafiltration avec du perméat d'ultrafiltration.

## **Caractérisation de la microstructure des matrices**

Comme nous l'avons déjà rappelé précédemment, la structure d'un fromage est complexe. Pour schématiser, il s'agit d'une dispersion de globules gras et/ou d'amas de matière grasse, et de colonies microbiennes dans une matrice caséique gélifiée dans laquelle les éléments solubles comme les protéines sériques, les sucres et les minéraux sont dissous. De plus, et pour compliquer d'avantage la caractérisation de cette matrice déjà très hétérogène, la structure du fromage évolue au cours du temps lors de son affinage du fait de l'activité métabolique et catabolique des microorganismes et des enzymes. Dans le cadre de la thèse de J. Valle, nous sommes en cours de rédaction d'une revue bibliographique faisant un état de l'art sur les techniques expérimentales actuellement utilisées pour caractériser la microstructure des matrices laitières. Sans rentrer dans les détails, on s'aperçoit que la plupart des méthodes développées jusqu'à présent dans le domaine laitier sont très descriptives. Nous sommes donc encore loin de la quantification de paramètres structuraux permettant de formaliser les propriétés de migration des solutés dans de tels milieux par des modèles mécanistiques.

La principale difficulté réside dans le fait qu'on ne peut pas véritablement assimiler cette matrice à un milieu poreux, puisque les mailles du gel protéique sont remplies de phase aqueuse et non de vide. D'une manière générale, les milieux poreux sont définis par deux critères : (1) le matériau doit contenir de petits espaces vides, appelés pores, délimités par une matrice solide; (2) le matériau doit être perméable à un écoulement de fluide (gaz ou liquide). Ces deux critères renvoient à deux caractéristiques essentielles d'un milieu poreux : la porosité, qui correspond à la fraction de vide, et la perméabilité, qui indique l'aptitude d'un milieu poreux à être traversé par un écoulement.

**Je propose dans ce projet d'essayer malgré tout de transposer des techniques expérimentales basées sur des techniques de microscopie confocale et électronique, déjà largement développées en science des matériaux pour caractériser finement des structures poreuses de manière non invasive.** Il sera utile d'avoir recourt à plusieurs techniques d'imagerie sachant qu'il n'existe pas de technique unique capable de nous fournir toutes les informations sur la morphologie d'une microstructure. Ceci impliquera un gros investissement dans le **développement de méthodes d'analyse d'images** pour accéder aux paramètres physico-chimiques de microstructures, qui me paraît tout à fait envisageable grâce à notre collaboration avec D. Legland, spécialiste du traitement d'image sur la plateforme logicielle du département CEPIA.

En ce qui concerne les outils de microscopie, nous disposons au STLO d'un microscope confocal qui nous permettra notamment de caractériser les matrices contenant de la matière grasse. En effet, en marquant spécifiquement la matière grasse et les protéines avec différentes sondes fluorescentes, il est possible d'avoir accès à la morphologie et à la distribution granulométrique des globules gras dans la matrice. La résolution n'étant pas suffisante pour caractériser la micro (-voire nano-) structure du réseau protéique de nos matrices fromagères, il faut faire appel aux techniques de microscopie électronique.

Nous avons pour cela récemment intégré (avril 2012) à notre équipe D2R, C. Cauty (IE), spécialiste de microscopie électronique, qui travaille depuis des années sur la plateforme de microscopie de Rennes (MRic-TEM). Pour des raisons de disponibilité immédiate du matériel et des outils, nous avons déjà commencé à caractériser la microstructure de nos différentes matrices modèles par Microscopie Electronique à Transmission. Cependant cette technique présente un caractère destructif et un risque d'introduction d'artefacts dans la microstructure observée à cause du problème de préparation de l'échantillon. En effet, l'échantillon doit être déshydraté, métallisé puis découpé en très fines sections avant observation en MET.



La plateforme de Microscopie de Rennes vient de s'équiper d'un système de cryo-fixation des échantillons par congélation hautes pressions qui nous offre la perspective très intéressante d'effectuer de l'imagerie en cryo-MET. Cette technique présente l'avantage de permettre de s'affranchir de la présence de colorant ou de fixateur chimique, respectant ainsi mieux la structure de l'objet. Cependant, elle est plus lourde à mettre en œuvre que la technique de coloration négative, car il faut congeler très rapidement les échantillons de façon à les figer dans une glace amorphe. Cette méthode, qui contrairement à la coloration négative n'utilise aucun additif, préserve la structure native de l'échantillon tout en permettant d'accéder à la structure interne de particules complexes.

Dans tous les cas, l'échantillonnage devra faire l'objet d'attention particulière car ce paramètre est essentiel pour valider et généraliser les résultats obtenus à l'intégralité du milieu analysé (Russ et Dehoff, 1986). L'optimisation de la technique par analyse d'image devra donc faire l'objet d'une étude détaillée destinée à établir un protocole expérimental fiable, reproductible et surtout représentatif de l'échantillon de matrice observé. De plus, il est important de garder à l'esprit que si les techniques microscopiques donnent une idée de la structure des milieux poreux, **elles ne fournissent généralement pas d'informations tridimensionnelles directes**. Pourtant, les caractéristiques d'un matériau dans l'espace  $R^3$  peuvent être obtenues à partir de mesures réalisées dans l'espace  $R^2$  en utilisant des relations stéréométriques détaillées par Russ et Dehoff (1986).

D'autres paramètres peuvent être importants au niveau microscopique, en particulier quand un fluide circule dans l'espace des pores. On peut citer la **connectivité**, qui caractérise le nombre de voisins pour un pore, la présence de bras morts (pores bouchés), ou encore la **topologie du volume des pores**. Le désordre géométrique est un caractère essentiel des milieux poreux. Cela empêche toute trajectoire en ligne droite incluse dans le volume des pores. On peut alors définir une **tortuosité**, qui représente le caractère non rectiligne des trajectoires.

La grande majorité des études morphologiques des matériaux souligne les problèmes engendrés par la qualité de la préparation de l'échantillon avant l'analyse, liés à l'acquisition, au traitement de l'image et à la validité de la mesure et des résultats obtenus via cette méthode (Coster et Chermant, 1989). La quantification de cette erreur restant un problème à part entière, la collaboration avec D. Legland nous permet d'envisager cette démarche, novatrice dans le domaine de la technologie fromagère, avec confiance.

## **Comment relier dynamique des solutés et évolution temporelle des matrices ?**

Jusqu'à présent, nous avons seulement envisagé de déterminer les propriétés de migration des solutés à un instant donné correspondant à un état particulier de la matrice fromagère modèle. En effet, les matrices sont emprésurées et la coagulation a lieu à 30°C pendant une heure pour favoriser l'activité enzymatique de la chymosine. Les expériences de FRAP sont ensuite réalisées après deux heures d'incubation des gels à une température de 19°C. Nous effectuons la fixation des échantillons pour l'analyse de leur microstructure en microscopie électronique ou le marquage des constituants par des sondes fluorescentes pour la microscopie confocale en faisant subir le même historique aux différentes matrices étudiées. Pourtant, nous savons pertinemment que **nos matrices fromagères évoluent énormément au plan de leur microstructure au cours de l'affinage du fait de la réorganisation du réseau protéique et des transformations enzymatiques**. Une fois que l'ensemble des techniques de caractérisation des paramètres structuraux des matrices seront au point, **il est donc nécessaire d'envisager d'étudier l'impact de l'évolution temporelle de la matrice sur les propriétés de migration des différents solutés**.

Pour cela, j'envisage d'effectuer des **mesures de FRAP à différents temps sur nos matrices en cours de transformation, afin de caractériser l'évolution de la valeur des coefficients de diffusion en fonction du temps, et de visualiser en parallèle la microstructure des produits à différents moments, en microscopie électronique et microscopie confocale**. Des verrous méthodologiques devront être surmontés, comme par exemple la baisse de fluorescence de la fluorescéine au cours du temps et de l'acidification (en présence des bactéries lactiques) et surtout, le phénomène d'exsudation des matrices, inéluctables au cours de la période de maturation du gel. Il est possible d'envisager d'introduire les solutés fluorescents à posteriori en les plaçant à la surface du gel. Ce travail représente un investissement humain et financier pour réaliser toutes les expérimentations nécessaires, pour lesquelles il faudra trouver un financement adéquat.

Il reste aussi à déterminer si la migration des solutés vers les colonies microbiennes immobilisées dans la matrice fromagère, constitue un facteur limitant pour l'activité métabolique des micro-organismes. En d'autres termes, nous cherchons à déterminer si la migration des solutés, substrats ou produits des réactions enzymatiques issus du métabolisme des cellules, engendre des micro-gradients de concentration, et donc un micro-environnement particulier autour des colonies ?

## **Porosité et micro-environnement des colonies**

Le fait que des molécules de taille conséquente puissent rentrer à l'intérieur des colonies immobilisées dans une matrice fromage nous a conduit à remettre en question l'importance de l'aire interfaciale bactéries/matrice sur l'activité métabolique des bactéries. Cependant, l'étude préliminaire que nous avons menée jusqu'à présent reste très limitée, autant au niveau des souches et des solutés migrants étudiés que de la composition de la matrice modèle. De plus, nous n'avons aucune idée des vitesses de migration des solutés (substrats ou métabolites) à l'intérieur des colonies. Celles-ci sont pourtant indispensables pour déterminer si oui ou non la diffusion est un phénomène limitant de l'activité catabolique des enzymes immobilisées au sein des colonies microbiennes dans le fromage. Il est donc certes important de caractériser la dynamique des solutés au sein de la matrice fromagère, mais il est **également primordial de s'intéresser également aux propriétés de migration** de l'ensemble de ces solutés à l'intérieur des colonies immobilisées.

Pour cela, les techniques expérimentales les plus utilisées depuis la fin des années 1990 sont basées sur la microscopie confocale, par étude de la vitesse de pénétration de solutés fluorescents de différentes tailles à travers le biofilm (Thurnheer et al., 2003), ou plus souvent par application des techniques dynamiques comme la FRAP et la FCS (Zhang et al., 2011 ; Waharte et al. 2010 ; etc.). Rani et al. (2005) ont développé une technique permettant de visualiser, de façon non invasive et en temps réel, la pénétration de deux traceurs fluorescents de taille comparable à celle de molécules d'antibiotiques, dans des amas de cellules de staphylocoques. L'analyse quantitative des images a permis de modéliser les valeurs de coefficients de diffusion effectifs de chaque soluté à partir des profils d'intensité de fluorescence, en considérant que les amas de cellules avaient une géométrie sphérique. Takenaka et al. (2009) ont mis au point une technique originale, appelée time-lapse CSLM, pour visualiser la diffusion de macromolécules marquées par fluorescence dans des biofilms dentaires modèles constitués de différentes espèces microbiennes. L'intensité de la fluorescence est mesurée de manière spatio-temporelle au sein des colonies microbiennes immobilisées dans un capillaire soumis à un flux continu de solution contenant le soluté fluorescent.

**Je souhaite m'inspirer de l'une ou l'autre de ces 2 techniques, basées sur une quantification spatio-temporelle de fluorescence par microscopie confocale, pour arriver à quantifier les cinétiques de pénétration de solutés ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes** (molécules de tailles croissantes, plus ou moins flexibles ou globulaires, plus ou moins chargées) **au travers de colonies microbiennes immobilisées**. Il est également primordial de **compléter cette étude par des expérimentations sur différentes espèces et souches bactériennes, ayant si possible des propriétés de surface différentes (plus ou moins hydrophobes), afin de vérifier si notre hypothèse selon laquelle l'interface d'une colonie immobilisée en matrice fromagère est plutôt de type « éponge » plutôt que « bulle » est généralisable à tous les microorganismes**. Enfin, il sera nécessaire de confirmer ces observations en complexifiant la composition de la matrice modèle, notamment en ajoutant la matière grasse qui semble jouer énormément sur la forme des colonies, et valider sur une matrice fromagère réelle issue d'une technologie fromagère traditionnelle (réseau beaucoup moins homogène donc contraintes anisotropes). Pour mener à bien ce projet, nous disposons d'un CDD, recruté dans l'équipe D2R en mai 2012 sur un poste d'Ingénieur d'Etudes pour 23 mois, spécialiste de microscopie confocal, que je co-encadre avec S. Jeanson.

## 4.2.2. Modélisation de l'action des enzymes protéolytiques immobilisées en matrice fromagère modèle

Des enzymes d'origine et de nature variées interviennent dans l'affinage du fromage : les protéases endogènes du lait (plasmin, cathepsine), la protéase ajoutée comme coagulant (chymosine) et les protéases et peptidases issues des différentes flores d'affinage. Ces enzymes hydrolysent la matrice protéique. L'action de ces enzymes est essentielle pour donner au fromage ses caractéristiques finales de texture et de flaveur. La protéolyse *in situ* repose sur trois éléments : i) l'action d'un système multienzymatique; ii) l'existence d'un substrat hétérogène et dynamique, correspondant à la matrice de caséines et à ses produits de dégradation sur laquelle agissent les enzymes protéolytiques ; et iii) l'influence de l'action des enzymes sur l'organisation de la matrice et vice versa.

D'innombrables travaux existent sur la description des enzymes et les cinétiques de dégradation des constituants (protéolyse, lipolyse...). Ces données sont extrêmement utiles, mais, reposant sur des quantifications après broyage des échantillons, elles ne donnent qu'une vision «moyennée». Ces travaux démontrent que les cinétiques d'hydrolyse dépendent fortement du fromage considéré mais sans pouvoir identifier les facteurs limitants de ces cinétiques : diffusionnels (accessibilité enzymes/substrats) ou réactionnels (niveau d'activité enzymatique).

Du fait de l'immobilisation des bactéries dans la matrice lors de la coagulation, la croissance bactérienne se fait sous forme de colonies, qui constituent des «points chauds» d'affinage par la concentration d'enzymes qu'elles apportent localement. Si on prend l'exemple de l'emmental, l'écosystème microbien de ce fromage est complexe, mais deux flores sont essentielles pour obtenir sa texture et sa flaveur typique : les bactéries lactiques thermophiles (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, et *Streptococcus thermophilus*) et les bactéries propioniques (*Propionibacterium freudenreichii*), qui font l'objet d'un ensemencement systématique. Le levain lactique se développe après moulage, acidifie le caillé pendant le pressage et hydrolyse une partie des caséines pour produire des peptides et des acides aminés précurseurs d'arôme (pendant l'affinage surtout). Les bactéries propioniques se développent lors de l'affinage en cave chaude et sont responsables de la formation d'ouvertures et de composés de flaveur.

D'après les travaux de V. Gagnaire et al. (1998, 2001, 2004), l'action concomitante et séquentielle des différentes enzymes protéolytiques conduit à un processus continu de dégradation de la matrice caséique et des peptides libérés de la matrice pendant l'affinage. Cependant, parmi les enzymes protéolytiques agissant dans la matrice fromagère, **les protéases de parois apparaissent comme un nœud de régulation sur lequel il est possible d'agir afin de moduler la structure de la matrice caséinique.** En effet, V. Gagnaire a montré que les activités enzymatiques des levains lactiques sont modulées de manière différente *in situ* par rapport aux études expérimentales menées *in vitro*, se traduisant notamment par une différence au niveau des sites de coupure des caséines. **Nous pensons que cette différence est causée par des facteurs environnementaux (pH, température, force ionique), mais aussi par l'accessibilité au substrat lui-même, qui est conditionnée par l'organisation des caséines dans la matrice.** Il se trouve d'ailleurs que l'évolution de l'organisation des caséines dans la matrice va de pair avec l'intensification de la protéolyse au cours de l'affinage.

En raison du nombre élevé des agents enzymatiques impliqués lors de la protéolyse en matrice fromagère, il est difficile d'avoir une vision mécanistique des cinétiques enzymatiques. **Notre objectif est de comprendre la dynamique réactionnelle des enzymes protéolytiques responsables des qualités de texture et de flaveur d'une matrice fromagère afin d'établir le lien entre la protéolyse *in situ* et**

**l'évolution de la structure de cette matrice et de ses fonctionnalités au cours de l'affinage.** Pour répondre à cette problématique complexe et multidisciplinaire, je compte mettre en commun mes compétences en génie des procédés et biotechnologie (acquise au cours de ma formation d'ingénieur à l'INSAT) avec les compétences en biochimie de V. Gagnaire.

Ainsi, nous **comptons développer une approche alternative basée sur un système "hors cellules microbiennes" et inspirée, pour la modélisation, des concepts de la biocatalyse hétérogène.** En effet, la biocatalyse hétérogène est née du constat que dans les systèmes vivants ou dans la nature, les enzymes n'agissent pratiquement qu'à l'état immobilisé, par exemple sur la surface des structures membranaires d'une cellule ou d'un organite cellulaire, ou adsorbées sur les composés argileux et humiques dans les sols. **L'immobilisation d'une enzyme sur un support de nature connue permet alors de déterminer l'effet du micro-environnement sur son activité catalytique.** Il est ainsi possible de mieux comprendre le fonctionnement *in vivo*, ce que ne permet pas une étude du comportement cinétique en solution homogène. **Pour nous aider dans cette démarche,** nous nous sommes rapprochés de **D. Combes et P. Monsan** (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) - (INSA UMR CNRS-INRA)), **spécialistes de catalyse enzymatique hétérogène,** et j'ai initié en octobre 2012 une **collaboration avec S. Gaucel** (GMPA Grignon), **expert en modélisation des systèmes biologiques complexes.**

Plus concrètement, nous allons commencer par immobiliser des enzymes protéolytiques dans (inclusion) ou sur (liaisons covalentes) des systèmes proches en taille des colonies bactériennes pour pouvoir étudier le mode d'action des protéases en déconnexion avec le métabolisme bactérien et notamment la production d'acide. Une étudiante en Master 2 de Chimie à l'Université Rennes 1 (J. Midelet) a été recrutée en février 2013 pour un stage de 5 mois sous ma direction, afin de **mettre au point un système d'étude modèle** d'une protéase immobilisée en matrice solide et **d'identifier le ou les facteurs limitants de l'activité enzymatique** (diffusion, réaction enzymatique, quantité d'enzyme, limitation en substrat, inhibition par les produits ?...). Nous commencerons par **mettre au point une méthode d'immobilisation d'une protéase déjà bien connue** (par exemple la subtilisine A issue de *Bacillus licheniformis*, sérine protéase appartenant à la même famille d'enzymes que les protéases de paroi des bactéries lactiques (*Lc. lactis* ou *L. helveticus* par exemple)).

**Au cours de ce projet, nous pourrons tester différents types de support d'immobilisation de tailles comparables à celles des colonies microbiennes (< 100 µm de diamètre) afin de trouver la méthode la plus adaptée à notre problématique :**

- des supports poreux de type billes de Sepharose™4B activées (GE Healthcare) pour simuler des colonies de type « éponge », pour lesquelles il faudra tenir compte des transferts de substrat internes et externes au support,
- et des supports non poreux de type microbilles de polystyrène (Wu et al., 1998) ou de silice fumée (Würges et al., 2005) pour simuler des colonies de type « bulle », et éviter les limitations diffusionnelles de substrat à l'intérieur du support.

Dans tous les cas, l'immobilisation des enzymes modifie leurs propriétés structurales et fonctionnelles. Bien souvent, on observe une augmentation de la stabilité thermique ou chimique ainsi qu'une diminution de l'activité enzymatique. Une dénaturation partielle peut également se produire lors de la fixation notamment par liaison chimique. **L'effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique sera donc évalué en comparant les cinétiques de l'enzyme en condition libre et immobilisée en milieu liquide (tampon ou phase aqueuse du fromage) de type réacteur batch infiniment mélangé sur un substrat caséique.**

**Enfin, nous modéliserons les cinétiques enzymatiques de l'enzyme immobilisée et incluse dans une matrice solide modèle.** Pour commencer, je pense que nous considérerons une **matrice modèle simple de type gel d'agarose, ce qui facilitera le suivi de la protéolyse des caséines ajoutées de manière contrôlée dans le milieu avant gélification.**

Pour accéder aux facteurs limitants de la réaction enzymatique, nous ferons varier plusieurs paramètres expérimentaux : i) la vitesse de diffusion des substrats et des produits en modifiant la taille des pores du réseau, qui dépend de concentration en agarose du gel (Narayanan et al., 2006); (ii) la quantité totale d'enzyme mise en œuvre en jouant sur la quantité de billes dispersées dans la matrice avant gélification, et/ou sur la taille des billes (simulant la taille des colonies bactériennes) pour modifier leur répartition dans la matrice.

**Deux méthodes de suivi des cinétiques enzymatiques sont envisagées :**

- (i) par quantification des peptides produits en utilisant des méthodes analytiques classiques après broyage d'un échantillon de matrice au cours du temps : dosage des peptides totaux par l'O-phthaldialdéhyde (OPA) (Church et al, 1983) ; dégradation de la caséine par électrophorèse SDS-PAGE ou HPLC ; et suivi de la production des peptides par HPLC phase inverse ;
- (ii) par suivi *in situ* de la protéolyse, de manière non destructive, en utilisant un substrat caséique marqué au FITC, assurant un « quenching » initial de la fluorescence, et dont l'intensité de fluorescence augmente au fur et à mesure de sa dégradation en plus petits peptides. La mesure du taux de protéolyse est alors envisageable par microscopie confocale.

Si les résultats sont prometteurs après ce stage de Master 2, je ferai appel à un post-doctorant ou ferai une demande de thèse MRT, ou cofinancée par l'INRA et la Région Bretagne, pour continuer ce projet de modélisation. En parallèle, nous ferons une demande de financement de type « Action Nouvelle Soutenue » (ANS) auprès du Département CEPIA de l'INRA. Nous tenterons alors d'adapter cette démarche expérimentale à des matrices caséiques, se rapprochant d'avantage de systèmes fromages réels, et modéliser les cinétiques enzymatiques de protéases et/ou peptidases d'affinage (i.e. protéases de paroi de bactéries lactiques telle *L. helveticus*).

### 4.3. Conclusion

Différentes approches méthodologiques ont été développées au cours de mon parcours pour explorer l'ensemble des questions de recherche posées avec une vision globale. Pour cela, j'ai dû mobiliser et intégrer de nombreuses compétences : en technologie fromagère, microbiologie, biochimie, microscopie, rhéologie et bien sûr en transfert de matière. Cette multidisciplinarité rend bien compte de la complexité des phénomènes physiques, biochimiques et microbiens mis en jeu lors de l'affinage d'un fromage. D'ailleurs, ces travaux de recherche ayant un caractère fortement exploratoire, nécessitant d'importants développements méthodologiques parfois incertains dans leur durée, ne facilitent pas la proposition de sujets de thèse aux étudiants, que nous devons souvent construire en combinant une partie sûre avec des retombées finalisées, et une partie plus « risquée » sur nos questions.

Pourtant, la localisation au sein de l'UMR STLO est un atout considérable, notamment grâce à sa plateforme et à son expertise technologique, offrant la possibilité de moduler les matrices fromagères modèles à volonté. L'expertise de l'équipe « Interactions structure - fonctionnalités des protéines et lipides » (ISF-PL) m'est également très précieuse pour les aspects de caractérisations micro- et macro-structurales des matrices. De plus, le Centre International de Ressources Microbienne-Bactéries d'intérêt alimentaire (CIRM-BIA) est une source de modèles bactériens appropriés.

Quant aux retombées de nos travaux de recherches, l'équipe « Biodiversité bactérienne et interactions *in situ* » (B2ISI) est très intéressée par les méthodologies originales d'études *in situ* que nous développons. Mes travaux intéressent également l'équipe « Transferts et interactions dans les procédés de l'industrie laitière » (TIPIIL), notamment sur les aspects de diffusion des solutés dans des matrices laitières concentrées (par filtration ou séchage). Des opportunités de pont scientifique existent enfin avec l'équipe « Bioactivité et Nutrition » (BN), si nous élargissons le questionnement de l'activité des enzymes au-delà de l'affinage, pendant la déstructuration des matrices fromagères dans le tube digestif.

Aux niveaux national et international, nous avons posé des jalons pour entreprendre des collaborations reconnues pour leur expertise, réseaux qui restent bien sûr à approfondir. En outre, nous disposons d'avancées méthodologiques intéressantes et nous voyons comme un atout l'originalité de notre positionnement à l'interface « bactéries /matrice ». En effet, ce positionnement est encore très original, tant sur le plan national qu'international. Nous avons d'ailleurs récemment prouvé notre avance au cours des nombreuses communications orales effectuées au mois de mai 2012 (N°42 à 45). Enfin, les industriels de la filière lait sont extrêmement intéressés par l'ensemble de nos travaux sur la distribution des colonies, l'activité des enzymes *in situ* et la diffusion des solutés. Pour preuve, nous avons obtenus en 2012 par le biais de l'association Bretagne Biotechnologie Alimentaire (BBA), qui regroupe l'ensemble des organismes de recherche et les professionnels laitiers du Grand Ouest, le financement d'une thèse MRT et de deux CDD de 23 mois sur notre thématique.

## 5. REFERENCES CITEES

- Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E. & Webb W. (1976).** Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16, 1055-1069.
- Balakrishnan, G., Nicolai T. & Durand. D. (2012).** Relation between the gel structure and the mobility of tracers in globular protein gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 88, 293-299.
- Beretta, S., Chirico, G. & Baldini. G (2000).** Short-range interactions of globular proteins at high ionic strengths. *Macromolecules*, 33, 8663-8670.
- Braga, J., Desterro, J.M.P. & Carmo-Fonseca, M. (2004).** Intracellular macromolecular mobility measured by Fluorescence Recovery after Photobleaching with Confocal Laser Scanning Microscopes. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 4749-4760.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M. & Fontaine-Aupart, M.-P. (2008).** Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2135-2143.
- Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., Ridge, Y. P., Seale, R. & Smith, A. C. (1995).** The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2 in gelatin gel. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 45-60.
- Bryers, J.D. & Drummond, F. (1998).** Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnology and Bioengineering* 60, 462-473.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., Cabane, B. (2010).** How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophysical Journal*, 99 (11), 3754–3762.
- Cai, L. H., Panyukov, S. & Rubinstein. M. (2011).** Mobility of nonsticky nanoparticles in polymer liquids. *Macromolecules* 44, 7853-7863.
- Carrerao G., McDonald D., Crawford E., de Vries G. & Hendzel M.J. (2003).** Using FRAP and mathematical modelling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins, *Methods*, 29, 14-28.
- Carvajal-Rondanelli, P.A. & Lanier, T.C. (2010).** Diffusion of Active Proteins into Fish Meat To Minimize Proteolytic Degradation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (9), 5300-5307.
- Chen, Y. & Sanford, M.S. (2000).** *In situ* biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *Journal of Cellular Biology*; 148, 863-70.
- Church, F.C., Swaisgood, H. E. Porter, D. H. & Catignani. G. L. (1983).** Spectrophotometric assay using O-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- Christensen, B. E. & Characklis, W. G. (1990).** Physical and chemical properties of biofilms, p. 93-130. In W. G. Characklis and K. C. Marshall (eds.), *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York.
- Colsenet, R. (2005).** Etude par RMN de la diffusion moléculaire: Influence de la structure des protéines



laitières à l'état liquide et gelifié. Thèse, Nantes.

**Colsenet, R., Soderman, O. & Mariette, F. (2005).** Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements. *Macromolecules*, 38 (22), 9171-9179.

**Colsenet, R., Soderman, O. & Mariette, F. O. (2006).** Pulsed field gradient NMR study of poly(ethylene glycol) diffusion in whey protein solutions and gels. *Macromolecules*, 39, 1053-1059.

**Coster, M. & Chermant, J.L. (1989).** Précis d'analyse d'images, 22<sup>e</sup> édition, Presses du CNRS, Paris. 550 p.

**Crank J. (1975).** The Mathematics of Diffusion, Oxford University Press, Oxford, U.K.

**de Gennes, P. G. (1971).** Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. *Journal of Chemical Physics*, 55, 572-579.

**de Gennes, P. G. (1979).** Brownian motions of flexible polymer chains. *Nature*, 282, 367-370.

**deBeer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1997).** Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 53, 151-158.

**Diaz, G., Wolf, W., Kostaropoulos, A. E. & Spiess, W. E. L. (1993).** Diffusion of low-molecular compounds in food model systems. *Journal of Food Processing and Preservation* 17 (6), 437-454.

**Flory, P. J. (1953).** Principles of polymer chemistry. Cornell University Press.

**Gagnaire, V., Lortal, S. & Léonil, J. (1998).** Free active peptidases are detected in Emmental juice extracted before ripening in the warm room. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 119-128.

**Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M. & Léonil, J. (2001).** Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(9), 4402-4413.

**Gagnaire, V., Piot, M., Camier, B., Vissers, J. P. C., Jan, G. & Léonil, J. (2004).** Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 94(2), 185-201

**Griffiths, P.C., Stilbs, P., Yu, G.E. & Booth, C. (1995).** Role of molecular architecture in polymer diffusion: a PGSE-NMR study of linear and cyclic poly(ethylene oxide). *Journal of Physical Chemistry*. 99(45), 16752-16756.

**Gros J.B. & Rüegg M. (1987).** Determination of the apparent diffusion coefficient of sodium chloride in model foods and cheese, in: Jowitt R. (Ed.), *Physical properties of foods-2*, Elsevier Applied Science, London, U.K., pp. 71-108.

**Guiot, E., Georges, P., Brun, A., Fontaine-Aupart, M.P., Bellon-Fontaine, M.N. & Briandet, R. (2002).** Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation. *Photochemistry and Photobiology* 75, 570-578.

**Habimana, O., Steenkeste, K., Fontaine-Aupart, M.-P., Bellon-Fontaine, M.-N., Kulakauskas, S. & Briandet, R. (2011).** Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 367-368.

**Hagman, J., Loren, N. & Hermansson. A. M. (2010).** Effect of gelatin gelation kinetics on probe diffusion determined by FRAP and rheology. *Biomacromolecules*, 11, 3359-3366.

**Hakovirta, J., Reunanen, J. & Saris, P. E. J. (2006).** Bioassay for Nisin in Milk, Processed Cheese, Salad Dressings, Canned Tomatoes, and Liquid Egg Products, *Applied Environmental Microbiology*, 72 (2), 1001-1005.

**Hermansson, A. M., Lorén, N. & Nydén. M. (2006).** The effect of microstructure on solvent and solute diffusion on the micro- and nanolength scales. Pages 79-100 in *Water properties of food, pharmaceutical and biological materials*. M. P. Buena, Welti-Chanes, J., Lillford, P. J. & Corti, H. R. ed. CRC.

**Johnson, E.M., Berk, D.A., Jain, R.K. & Deen W.M. (1996).** Hindered diffusion in agarose gels: test of effective medium model. *Biophysical Journal* 70(2):1017-1023.

**Kabanova, N., Stulova, I. & Vilu, R. (2012).** Microcalorimetric study of the growth of bacterial colonies of *Lactococcus lactis* IL1403 in agar gels. *Food Microbiology* 29, 67-79.

**Kaláb, M. , Allan-Wojtas, P.& Miller, S. (1995).** Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science & Technology* vol. 6, no6, pp. 177-186

**Karbowiak, T., Hervet, H., Leger, L., Champion D., Debeaufort F. & Voilley A. (2006).** Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application, *Biomacromolecules*, 7, 2011-2019.

**Kiefer, P. (1977).** Der Einfluss von Scherkräften auf die Tröpfchenzerkleinerung beim Homogenisieren von Öl-in-Wasser-Emulsionen in Hochdruckhomogenisierdüsen. PhD Thesis Karlsruhe, Universität Fridericiana Karlsruhe.

**Kinsella, N. & Whitehead. D. M. (1989).** Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advance in Food Nutrition Research*, 33, 343-438.

**Kleinig, A. R. & Middleberg, A. P. J. (1996).** The correlation of cell disruption with homogenizer valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. *Chemical Engineering Science*, 51 (23): 5103-5110.

**Kleinig, A. R. & Middleberg, A. P. J. (1997).** Numerical and experimental study of a homogenizer impinging jet. *American Institute of Chemical Engineering Journal*, 43 (4): 1100-1107.

**Kleinig, A. R. & Middleberg, A. P. J. (1998).** On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, 53 (5): 891-898.

**Kumar, P. S. & Pandit, A. B. (1999).** Modeling hydrodynamic cavitation. *Chemical Engineering Technology*, 22: 1017-1027.

**Lacroix-Gueu, P., Briandet, R., Leveque-Fort, S., Bellon-Fontaine, M.N. & Fontaine-Aupart, M.P. (2005).** *In situ* measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *Comptes Rendus Biologies* 328, 1065-1072.

**Laloy, E., Vuilleumard, J.C., ElSoda, M. & Simard, R.E. (1996).** Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. *International Dairy Journal* 6, 729-740.

**Le Feunten, S. (2007).** Diffusion de sondes moléculaires mesurée par RMN à gradient de champ pulsé: Application à l'étude de l'évolution de la structure des systèmes caséiques au cours de la formation des gels, Thèse de l'Université de Nantes, 250p.

**Le Feunteun, S. & Mariette, F. (2008).** PFG-NMR techniques provide a new tool for continuous investigation of the evolution of the casein gel microstructure after renneting. *Macromolecules* 41(6), 2071-2078.

**Lebrun, L. & Junter, G. A. (1993).** Diffusion of sucrose and dextran through agar gel membranes. *Enzyme and Microbial Technology*. 15, 1057-1062.

**Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K. & Peetz, P. (1995).** Submerged bacterial colonies within food and model systems: Their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology* 28, 299-315.

**Libicki, S.B., Salmon, P.M. & Robertson, C.R. (1988).** The effective diffusive permeability of a nonreacting solute in microbial cell aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 68-85.

**Loncin, M. (1980).** Diffusion Phenomena in Solids. In: *Food Process Engineering Vol.1*, P. Linko at al., Eds, Applied Science Publ., London.

**Lorén, N., Nydén, M. & Hermansson, A.-M. (2009).** Determination of local diffusion properties in heterogeneous biomaterials, *Advances in Colloid and Interface Science*, 150 (1), 5-15.

**McMahon, D.J. & Oommen B.S. (2008).** Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 91, 1709–1721.

**Malakar, P. K., Brocklehurst, T. F., Mackie, A. R., Wilson, P. D. G., Zwietering, M. H., & van't Riet, K. (2000).** Microgradients in bacterial colonies: use of fluorescence ratio imaging, a non-invasive technique. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 71-80.

**Masaro, L. & Zhu, X.X. (1999a).** Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*, 24, 731-775.

**Masaro, L. & Zhu, X.X. (1999b).** Self-diffusion of end-capped oligo(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous solutions and gels. *Macromolecules*, 32, 5383-5390.

**Matsukawa, S. & Ando, I (1997).** Study of self-diffusion of molecules in a polymer gel by Pulsed-Gradient Spin-Echo <sup>1</sup>H NMR. 2. intermolecular hydrogen-bond interaction between the probe polymer and network polymer in N,N-Dimethylacrylamide acrylic acid copolymer gel systems. *Macromolecules*, 30, 8310-8313.

**McKay, A. L., Peters, A. C. & Wimpenny, J. W. T. (1997).** Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. *Letters in Applied Microbiology* 24:74-76.

**Mitchell, A.J. & Wimpenny, J.W.T. (1997).** The effects of agar concentration on the growth and morphology of submerged colonies of motile and non-motile bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 83, 76-84.

**Nakayama, Y. (1964).** Action of the fluid in the air-micrometer (3rd report, characteristics of double-disc nozzle No.1, in the case of compressibility being ignored). *Bulletin of the Japan Society of Mechanical*

Engineers, 7, 698-707.

**Nugent, L. J. & Jain. R. K. (1984).** Plasma pharmacokinetics and interstitial diffusion of macromolecules in a capillary bed. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 246, 129-137.

**Oancea, E. & Meyer T. (1998).** Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*, 95, 307-18.

**Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F. & Meyer, T. (1998).** Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *Journal of Cellular Biology*, 140, 485-98.

**Pajonk A.S., Saurel R. & Andrieu J. (2003).** Experimental study and modelling of effective NaCl diffusion coefficients values during Emmental cheese brining, *Journal of Food Engineering*, 60, 307-313.

**Payet, L., Ponton, A. Léger, L. Hervet, H. Grossiord, J. L. & Agnely. F. (2008).** Self-diffusion in chitosan networks: from a gel-gel method to Fluorescence Recovery after Photobleaching by fringe pattern. *Macromolecules*, 41, 9376-9381.

**Perry, P.A., Fitzgerald, M.A. & Gilbert, R.G. (2006).** Fluorescence recovery after photobleaching as a probe of diffusion in starch systems. *Biomacromolecules*, 7 (2), 521-530.

**Phipps, L. W. (1975).** The fragmentation of oil drops in emulsions by a high-pressure homogenizer. *Journal of Physics. D: Applied Physics*, 8: 448-462.

**Pluen, A., Netti, P.A., Jain, R.K. & Berk, D.A. (1999).** Diffusion of macromolecules in agarose gels: Comparison of linear and globular configurations. *Biophysical Journal*, 77(1), 542-552.

**Prausnitz, M. R. & Noonan. J. S. (1998).** Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *Journal of Pharmaceutical Science*, 87, 1479-1488.

**Presley, J.F., Cole, N.B. , Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J. & Lippincott-Schwartz, J. (1997).** ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*, 389, 81-85.

**Reits, E.A. & Neefjes, J.J. (2001).** From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biology*, 3, E145-7.

**Russ, J.C. & Dehoff, R.T. (1986).** 'Practical Stereology', 2nd edition, Plenum Press, New York.

**Saboya, L. V. (2002).** Lise de *Lactococcus sp.* e proteolise em queijos fabricados com ultrafiltração e microfiltração. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Thesis, 203p.

**Saltzman, W. M., Radomsky, M. L. Whaley, K. J. & Cone. R. A. (1994).** Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophysical Journal*, 66, 508-515.

**Seiffert, S. & Oppermann, W. (2008).** Diffusion of linear macromolecules and spherical particles in semidilute polymer solutions and polymer networks. *Polymer* 49(19), 4115-4126.

**Siegrist, H. & Gujer, W. (1985).** Mass-transfer mechanisms in a heterotrophic biofilm. *Water Research*, 19, 1369-1378.

- Skandamis, P.N., Brocklehurst, T. F., Panagou, E.Z. & Nychas, G.-J.E. (2007).** Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157:H7 in gel cassettes. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 937–947.
- Stevenson, M. J. & Chen, X. D. (1997).** Visualization of the flow patterns in a high-pressure homogenizing valve using a CFD package. *Journal of Food Engineering*, 33: 151-165.
- Stewart, P. S. (1998).** A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 59, 261-272.
- Taisne, L., Walstra, P. & Cabane, B. (1997).** Recoalescence during emulsification. *Deuxième congrès mondial de l'émulsion, Bordeaux, vol 1.*
- Takenaka, S., Pitts, B., Trivedi, H.M. & Stewart, P.S. (2009).** Diffusion of macromolecules in model oral biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1750-1753.
- Tao, H., Lodge, T. P. & von Meerwall. E. D. (2000).** Diffusivity and viscosity of concentrated hydrogenated polybutadiene solutions. *Macromolecules*, 33, 1747-1758.
- Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Devliehere, F. & Van Impe, J. F. (2009).** Extracting information on the evolution of the living- and dead-cell fractions of *Salmonella typhimurium* colonies in gelatin based on microscopic images and plate-count data. *Letters in Applied Microbiology* 49:39-45.
- Thurnheer, T., Gmur, R., Shapiro, S., & Guggenheim, B. (2003).** Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 1702-1709.
- Varzakas T.H., Leach G.C., Israilides C.J. & Arapoglou D. (2005).** Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 29-41.
- Waharte, F., Steenkeste, K., Briandet, R. & Fontaine-Aupart, M.-P. (2010).** Local diffusion measurements inside biofilms by FRAP analysis with a commercial confocal laser scanning microscope. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5860–5869.
- Walker, S.L., Brocklehurst, T.F. & Wimpenny, J.W.T. (1997).** The effects of growth dynamics upon pH gradient formation within and around subsurface colonies of *Salmonella typhimurium*, *Journal of Applied Microbiology*, 82 (5), 610-614.
- Wright, A.K. & Thompson, M.R. (1975).** Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophysical Journal*, 15, 137–41.
- Wu, C.W., Lee J.G. & Lee W.C. (1998).** Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27, 225-230.
- Wurges, K., Pfromm, P.H., Rezac, M.E. & Czermak, P. (2005).** Activation of subtilisin Carlsberg in hexane by lyophilization in the presence of fumed silica. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 34, 18-24.
- Zhang, Z., Nadezhina, E. & Wilkinson, K.J. (2011).** Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 1075-1081.

## 6. ANNEXES

### Annexe 1. Publications d'enseignement.

Chacun de mes enseignements est supporté par une projection de diapositives, parfois complétée par des ouvrages d'enseignements ou des documents rédigés.

- Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brulé G (Eds.), Science des aliments, Vol. 1 : Stabilisation biologique et physico-chimique, Tec&Doc Lavoisier, Paris, 2006, 383p.
- Flourey J, Jeantet R. La filtration – TICE (Plateforme de téléformation d'Agrocampus Rennes).
- Stabilisation biologique et physicochimique des aliments – Document rédigé, 135p. Flourey J, Schuck P, Croguennec C, Jeantet P.
- Procédés de stabilisation physicochimique – 38 diap., Flourey J, Croguennec T, Jeantet R.
- Les techniques séparatives sur membranes (partie 1)– 59 diap., Flourey J.
- Les techniques séparatives sur membranes (partie 2)– 68 diap., Flourey J.
- L'extrusion : Opérations Unitaires mécaniques – 33 diap., Flourey J.
- L'homogénéisation du lait – 22 diap., Flourey J.
- Les procédés de décantation appliqués à l'industrie laitière – 21 diap., Flourey J.
- Stabilisation et techniques de séparation des systèmes dispersés (émulsions, mousses) – 80 diap., Flourey J.
- Conception des opérations industrielles d'agitation et de mélange – 84 diap., Flourey J.
- Dispersions liquides-liquides et création des émulsions : voies classiques et alternatives pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique – 57 diap., Flourey J.
- Préparation de galactose – 9 diap., Flourey J.
- Bioconversions microbiennes – 168 diap., Flourey J.
- Génie enzymatique et biologique: les bioréacteurs – 77 diap., Flourey J.
- TP Bioréacteurs enzymatique – 8p., Flourey J.
- Réfrigération – Congélation – 40 diap., Flourey J.
- Approfondissement pratique en Génie Alimentaire (Congélation, Stérilisation, Pasteurisation, Séchage) – 31p., Flourey J., Jeantet R., Le Floch C.

## Annexe 2. Procédé innovant de stabilisation par champs électriques pulsés des produits laitiers

### ▪ Publications N°8 et 9.

Les procédés de stabilisation par la chaleur (traitements thermiques) utilisés industriellement sont très efficaces mais détruisent en partie les qualités organoleptiques des produits. Une des tendances actuelles de l'industrie alimentaire est donc de rechercher des procédés alternatifs à ces traitements, qui soient efficaces sur le plan de la destruction bactérienne, mais qui soient moins sévères au plan physico-chimique, afin de garantir la qualité hygiénique des aliments tout en préservant leurs qualités nutritionnelles, sensorielles et fonctionnelles.

L'exposition d'une cellule animale ou végétale à un champ électrique extérieur induit une différence de potentiel électrique de part et d'autre de sa membrane. Lorsque ce champ électrique est très intense (supérieur à  $10 \text{ kV.cm}^{-1}$ ), il induit un potentiel transmembranaire de valeur plus élevée que le potentiel de la cellule. Au-delà d'une valeur critique approximativement égale à 1 V, les phénomènes de répulsion entre les molécules chargées de la membrane entraînent la formation de pores dans la membrane cellulaire augmentant sa perméabilité. La formation irréversible de pores entraîne la migration vers l'extérieur du contenu cellulaire et ainsi la mort de la cellule. Les traitements par champs électriques pulsés (CEP) permettent ainsi d'obtenir des hauts degrés de dégradation des microorganismes tout en étant rapides et à faible température.

Le laboratoire a mis au point avec la société EUROPULSE (2000-2001) un pilote de champs électriques pulsés équipé de cellule de traitement continu ou discontinu dans le cadre du programme AQS 99P0631. Ce pilote présentait l'avantage par rapport aux équipements de CEP existants de pouvoir générer des impulsions électriques rectangulaires et parfaitement contrôlées en termes d'amplitude (25 à  $80 \text{ kV.cm}^{-1}$ ), de temps de palier (50 ns à 3  $\mu\text{s}$ ) et de fréquence (815 Hz maximum), ceci grâce à une technologie originale de commutation par éclateur.

### ▪ Principaux résultats

La première phase de l'étude a été d'évaluer l'efficacité des traitements en continu par CEP réalisés à température non létale ( $< 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sur la destruction de la flore endogène et des coliformes du lait ainsi que sur du lait préalablement inoculé avec *Salmonella enteritidis*. Nos expériences ont permis de montrer que l'efficacité des traitements est très limitée puisque au maximum 1,4 log de réduction microbienne a pu être atteint sur la flore endogène et *S. enteritidis*. Parallèlement, l'effet des traitements par champs électriques pulsés sur les principales caractéristiques physico-chimiques et techno-fonctionnelles du lait a été évalué. Il a ainsi été montré que la viscosité du lait diminuait tandis que ses aptitudes à la coagulation augmentaient suite au traitement par CEP. **Contrairement à ce qui est classiquement reporté dans la littérature, les traitements par CEP ont donc un impact non nul sur des constituants du lait tels que les micelles de caséine.**

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si des synergies existaient lors du couplage des CEP avec un traitement thermique en matière d'inactivation de *Salmonella enteritidis* dans le lait écrémé, et ainsi proposer des traitements de stabilisation correspondant au concept de traitement minimum. Les paramètres de résistance thermique ( $D_0$  et  $z$ ) du microorganisme d'étude ont d'abord été caractérisés par traitements thermiques du lait écrémé en cuve thermostatée. L'effet du process en continu couplant CEP puis traitement thermique a ensuite été évalué, en comparant l'efficacité de la

destruction obtenue à la suite soit d'un traitement CEP seul, soit d'un traitement thermique seul (effectué sur le même équipement). D'après les paramètres de résistance thermique, le traitement thermique du lait écrémé à 62°C pendant 19 s doit entraîner une destruction de 1.7 log. Le traitement par CEP seul a permis l'obtention d'un taux d'inactivation de  $1.2 \pm 0.3$  log, et le couplage des deux opérations unitaires a entraîné une réduction de *Salmonella enteritidis* de  $2.3 \pm 0.4$  log. La mise en cascade des deux opérations unitaires CEP et traitement thermique modéré est donc plus efficace qu'un traitement par CEP seul ou qu'un traitement thermique classique, mais on peut plutôt conclure à un effet létal d'ordre cumulatif qu'à un effet synergique.