



HAL
open science

Identification des liaisons polymères - Blanc d'oeuf lors de la cuisson des oeufs pochés

Morgan Deroine

► **To cite this version:**

Morgan Deroine. Identification des liaisons polymères - Blanc d'oeuf lors de la cuisson des oeufs pochés. 2011, pp.1-52. <hal-01454141>

HAL Id: hal-01454141

<https://hal.science/hal-01454141v1>

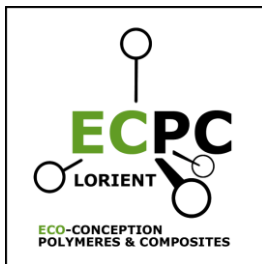
Submitted on 6 Jun 2020

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

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



HAL Authorization



Master SPI
« Sciences pour l'Ingénieur »

Parcours ECPC
« Éco-Conception des Polymères & Composites »



Stage de Master 2^{ème} année

**IDENTIFICATION DES LIAISONS
POLYMERES - BLANC D'ŒUF LORS DE LA
CUISSON DES ŒUFS Poches**

Morgan DEROINE

INRA - Agrocampus Ouest
Année 2010 - 2011



Maîtres de stage
Valérie LECHEVALIER & Cécile LE FLOCH-FOUERE

Tuteur UBS
Stéphane BRUZAUD

- Remerciements -

Je tiens tout d'abord à remercier Valérie Lechavalier et Cécile Le Floch-Fouéré pour avoir répondu à ma candidature, m'avoir très bien accueillie et pour leurs suivis tout au long du stage.

Je remercie aussi Monsieur Carlier, ancien directeur de l'entreprise du Domaine des Genêts, qui est l'origine de ce stage ainsi que le groupe CECAB, nouveau propriétaire, pour le financement de celui-ci.

Je remercie également Sophie Laurent et Nuttinee Musikaphun, stagiaires, pour leur aide et leur amitié ainsi que Claire Prioul et Maryvonne Pasco pour leur soutien et leurs conseils techniques pour réaliser les différentes manipulations.

Je tiens donc à remercier tous les enseignants-chercheurs d'Agrocampus Ouest (Françoise Nau, Thomas Croguennec, Catherine Guérin-Dubiard, Romain Jeantet, Julianne Floury...) : une équipe accueillante, dynamique et performante dans laquelle j'ai pu m'intégrer facilement afin d'accroître et d'enrichir mes connaissances.

Je tiens à remercier également Monsieur Stéphane Bruzard qui a été mon tuteur pendant ces quatre mois de stage sans oublier Monsieur Christophe Baley qui sera présent lors de ma soutenance et participera à la notation de mon stage.

- Glossaire -

Adhésivité : Aptitude à créer des forces d'interactions entre deux surfaces [60].

Ellipsométrie : C'est une technique optique de caractérisation et d'analyse de surface, fondée sur le changement d'état de polarisation de la lumière, par réflexion de la lumière sur la surface plane d'un échantillon (on peut déduire la quantité de protéines absorbées sur les surfaces). [19] [35] [36]

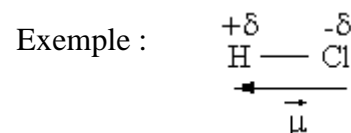
Fluorophore : C'est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore de molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π .

Glycoprotéine : Elles représentent la plus grande partie des protéines. Elles possèdent un pourcentage massique très variable de sucres et d'acides sialiques. Beaucoup d'hormones sont des glycoprotéines dont une partie de celles qui interviennent dans le mécanisme de production. [74]

Ionomère : C'est un copolymère thermoplastique « réticulé ioniquement » qui contient une faible proportion (de 1 à ~10%) de motifs de répétition portant des groupes ioniques.

Moment dipolaire : On appelle dipôle le système formé de deux charges égales mais de signe opposé séparé par une distance d . Un dipôle est caractérisé par son moment dipolaire électrique μ tel que

$$\|\vec{\mu}\| = q \cdot d = \mu$$



Mouillabilité : Aptitude à créer un contact entre deux surfaces [60].

Phosphoglycoprotéine : La caséine de lait, par exemple, contient de l'acide phosphorique attaché à la chaîne polypeptidique. On notera que de nombreuses protéines sont phosphorylables sous l'action d'enzymes dans les cellules de nombreux organismes (dont l'organisme humain).

Protéines fibrillaires : Ces protéines peuvent former des fibres, elles ont généralement une solubilité faible en milieu aqueux (fibrinogène du sang...) ou nulle (collagène, kératine). En raison de leur nature, on les rencontre très rarement dans les analyses biologiques, celles-ci s'effectuant en solution aqueuse. [74]

Protéines Globulaires : Elles représentent les protéines de masse moléculaire de plusieurs dizaines de milliers de daltons dont l'albumine du sang, du lait et du blanc d'œuf. [74]

- Sommaire -

Introduction	2
Présentation des structures	3

Partie A : Recherches bibliographiques

I - Des acides aminés aux protéines

1) Les Acides Aminés	5
2) Les protéines	6

II - Le blanc d'œuf

1) Structure de l'œuf	8
2) Composition du blanc d'œuf	8
3) Les différentes protéines	9
4) Les propriétés des protéines	10

III - Les plastiques dans l'emballage

1) Généralités	11
2) Présentation du Surlyn	11
3) Les alternatives.....	12

IV - Les mécanismes d'adhésion

1) Les liaisons chimiques	14
2) L'adhésion	15
3) Thermodynamique	16

V - Les interactions protéines / films plastiques

1) Etat de l'art	17
2) Les méthodes de caractérisation	19

Partie B : Manipulations

I - Matériels et méthodes

1) les œufs	23
2) les polymères	23
3) les outils utilisés	24

II - Résultats et discussion

1) Fluorescence	26
2) Traction	28

III – Perspectives 29 |

Conclusion	30
Références	32

- Introduction -

L'industrie des ovoproduits comporte un secteur dit « produits élaborés » parmi lesquels on retrouve les omelettes, les œufs dur, les œufs pochés... destinés à la restauration hors domicile. Certains de ces produits sont cuits directement dans l'emballage pour de nombreuses raisons : augmentation de la durée de vie, meilleure qualité, meilleur rendement ... Il s'avère que, lors de la cuisson, des liaisons entre l'emballage et le blanc d'œuf se créent et posent des problèmes lors de l'ouverture des conditionnements. Par empirisme, la société a développé une formulation (un mélange d'huile) qu'elle pulvérise sur les films plastiques pour éviter ces problèmes d'adhérence. Aujourd'hui, elle souhaite éliminer cette formulation qui impose des contraintes qualité. En effet, ces huiles ne doivent pas être obligatoirement signalées sur l'emballage, mais avec la nouvelle législation concernant l'étiquetage, plus exigeante vis à vis des OGM et des allergènes, ces huiles vont perdre leur statut d'agent technologique. Considérées comme additifs, elles devront apparaître dans la composition du produit sur l'étiquette de l'emballage. Pour cela, il est essentiel de comprendre les liaisons qui se mettent en place afin d'envisager un moyen de les éviter.

L'un des objectifs de ce stage est de compléter la bibliographie concernant les interactions entre les protéines du blanc d'œuf et les films plastiques. Il est également important de référencer les techniques qui permettent de caractériser la présence ou non de protéines sur les films plastiques ainsi que les forces d'adhésion présentes. Un autre objectif est de mettre en place des expérimentations simples qui permettront de définir les raisons de l'adhésion afin d'envisager un emballage plus adéquat.

Pour le moment, nous avons consacré beaucoup de temps aux recherches bibliographiques. C'est pourquoi dans une première partie, nous présenterons les différents éléments qui permettront une meilleure compréhension du sujet et de la problématique du stage. Dans un premier temps, nous rappellerons quelques bases essentielles sur la biochimie structurale des protéines. Puis une description rapide de l'œuf ainsi que de l'emballage utilisé actuellement par l'entreprise seront exposés. Les mécanismes d'adhésion et les recherches concernant les interactions protéines-surface seront évoqués dans un second temps.

Dans une deuxième partie, nous décrirons les différentes manipulations réalisées ainsi que les méthodes suivies. Puis nous discuterons des premiers résultats obtenus qui semblent encourageants pour la suite. Les perspectives du stage seront aussi exposées.

- Présentation des structures -

Laboratoire de recherche :

INRA - Agrocampus Ouest STLO « Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf »

L'Unité Mixte de Recherches INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et Agrocampus Ouest STLO est créée le 1^{er} janvier 2004 à partir du Laboratoire de Recherche de Technologie Laitière (LRTL) et du laboratoire de technologie des ovoproduits de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (ENSAR). Implantée à Rennes, l'UMR 1253 STLO regroupe une centaine de personnes dont 75 permanents, 30 doctorants et post-doctorants et 15 détachés d'entreprises.

Son objectif global est de générer des connaissances sur l'organisation structurale des constituants des deux aliments, le lait et l'œuf, sur la maîtrise des principaux procédés qui leur sont appliqués, incluant leurs conséquences fonctionnelles et nutritionnelles, et sur les mécanismes biologiques (enzymatiques et microbiens notamment) impliqués dans leur transformation ou leur altération. Six équipes de recherche travaillent en étroite collaboration pour faire avancer leurs priorités scientifiques. Toutes ensemble, elles offrent un panel complet d'outils et d'expertises en biochimie, physico-chimie, procédés et microbiologie, permettant des approches pluridisciplinaires des questions de recherche :

- ISFPL : Interactions, Structures, Fonctionnalités des Protéines et des Lipides
- D2R : Dynamique Diffusionnelle et Réactionnelle au sein des matrices laitières
- BN : Bioactivité & Nutrition
- TIPIL : Transferts, interactions, Procédés-produits, Industrie Laitière
- B2ISI : Biodiversité Bactérienne et Interactions In Situ
- MICOV : Microbiologie de l'oeuf et des ovoproduits
-

J'effectue mon stage au sein de l'équipe ISFPL qui regroupe une dizaine de personnes. Elle travaille sur différents axes comme les propriétés des protéines globulaires à l'interface, leur rôle et leur structure, les lipides du lait ou encore sur la formation de nanoparticules entre protéines...

Partenaire industriel :

Domaine des Genêts (filiale du groupe CECAB)

Producteur d'œufs en coquille depuis plus de 30 ans, c'est en 1991 que le Domaine des genêts se lance dans la fabrication des œufs pochés en adaptant, dans ses locaux, la technique de cuisson sous vide. En 2010, le Domaine des Genêts, situé à Pierrefitte-sur-Sauldre (41), est racheté par le Groupe CECAB pour assurer la production et le conditionnement d'œufs pochés pour la Restauration Hors Domicile.

Le groupe CECAB (CEntrale des Coopératives Agricoles Bretonnes) dispose de sa propre usine d'aliment du bétail, de fermes de pontes, de centres de conditionnement pour les œufs coquilles, de casseries d'œufs et d'usines de cuisson pour les produits élaborés. Cette organisation en filière permet de garantir une traçabilité et une qualité optimale.

En effet, le service avicole CECAB assure le suivi des élevages de poulettes et de pondeuses. L'aliment est fourni par CECALIMENT (certifié ISO 9001) qui permet de contrôler rigoureusement l'alimentation des poulettes et des pondeuses. Le groupe dispose également d'une casserie (ABCD) à Ploërmel, produisant une gamme complète d'ovoproduits frais ou congelés déclinée en blancs, jaunes ou entiers. Deux sites de production (PEP) assurent la fabrication des produits élaborés d'œufs, à Ploërmel (56) et Carvin (62). Ces sites, disposant d'une technologie moderne, produisent des gammes fraîches et surgelées, adaptées aux besoins de leurs clients (omelettes, tortillas, œufs plats, œufs durs, blancs en neige...).

Le processus industriel de fabrication des œufs pochés est détaillé en figure 1 :

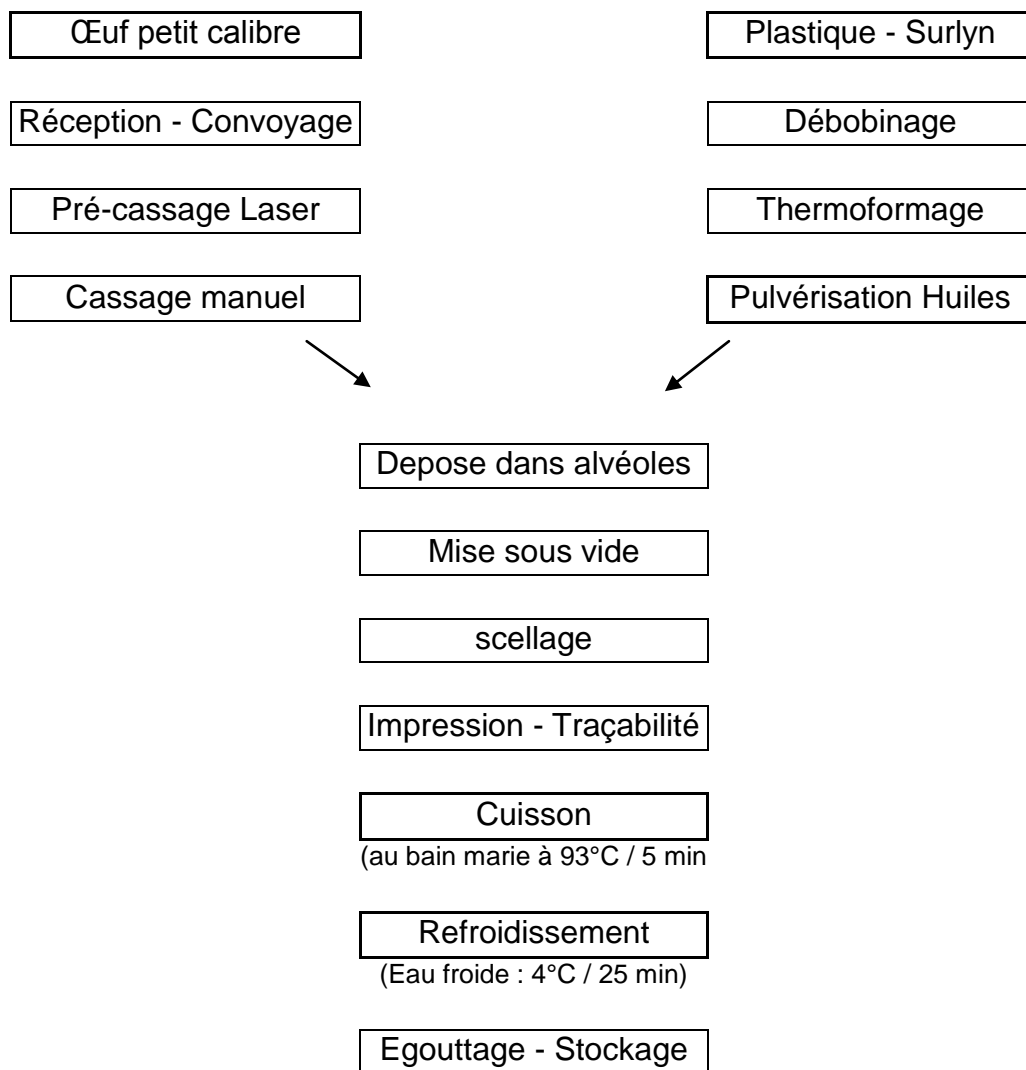


Figure 1 : Processus de fabrication [46]

La cuisson est réalisée directement dans l'emballage après le scellage de l'opercule. La température appliquée (93°C +/- 2°C pendant 5 minutes) est suffisante pour assurer la salubrité de l'œuf. Il permet en effet de diminuer d'un facteur 5 la population de micro-organismes. De plus, cette étape de pasteurisation est indispensable pour une bonne coagulation du blanc d'œuf (Cf §II 4).

Partie A

Recherches bibliographiques

I - Des Acides Aminés aux protéines

1) Les acides aminés

Les acides aminés sont des éléments constitutifs des peptides et protéines. C'est la formation d'ammoniac qui permet la synthèse d'acides aminés (fixation d'azote).

a - Définition :

Un acide aminé est un composé chimique contenant les groupes fonctionnels de type carboxyle (COOH) et amine (NH₂), attachés à un atome de carbone. Le squelette est le même pour tous les acides aminés et R représente la chaîne latérale, qui identifie l'acide aminé (figure 2).

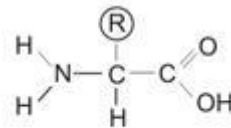


Figure 2 : représentation chimique d'un acide aminé [52]

b - Propriétés physico-chimiques

Les acides aminés ont un caractère amphotère. En solution et fonction du pH, les acides aminés s'ionisent. En effet, le groupement amine gagne un hydrogène (NH₃⁺) et le groupement acide en perd un (COO⁻). En fonction de la position de NH₂, il y a deux configurations possibles (énantiomères) et l'hydrophobie de l'acide aminé se détermine par la nature du groupement R.

Les acides aminés peuvent se lier les uns aux autres par une liaison peptidique. En effet, la liaison peptidique se fait entre le groupement acide (COOH) d'un acide aminé et le groupement amine (NH₂) de l'autre. Au cours de la réaction, il y a formation d'une fonction amide et une molécule d'eau est éliminée (figure 3). Il s'agit donc d'une réaction de condensation :

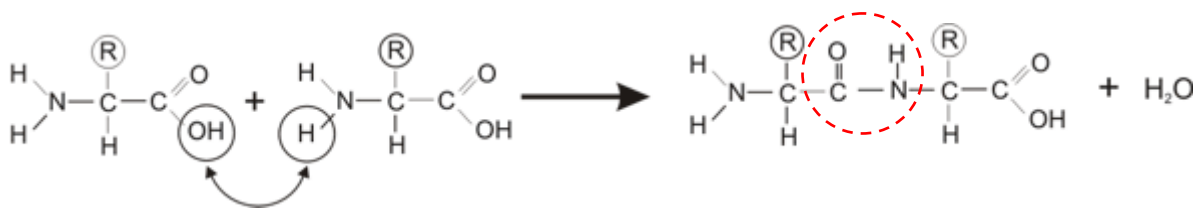


Figure 3 : formation de la liaison peptidique [52]

c - Les principaux acides aminés

Les 20 acides aminés de la figure n°4 sont tous constitués de la molécule représentée figure 2 à laquelle est associé un radical (R) qui les différencie. Ils peuvent être classés en fonction de leur structure chimique (aliphatique, hydroxyle, soufrés, aromatique...) et de leur polarité.

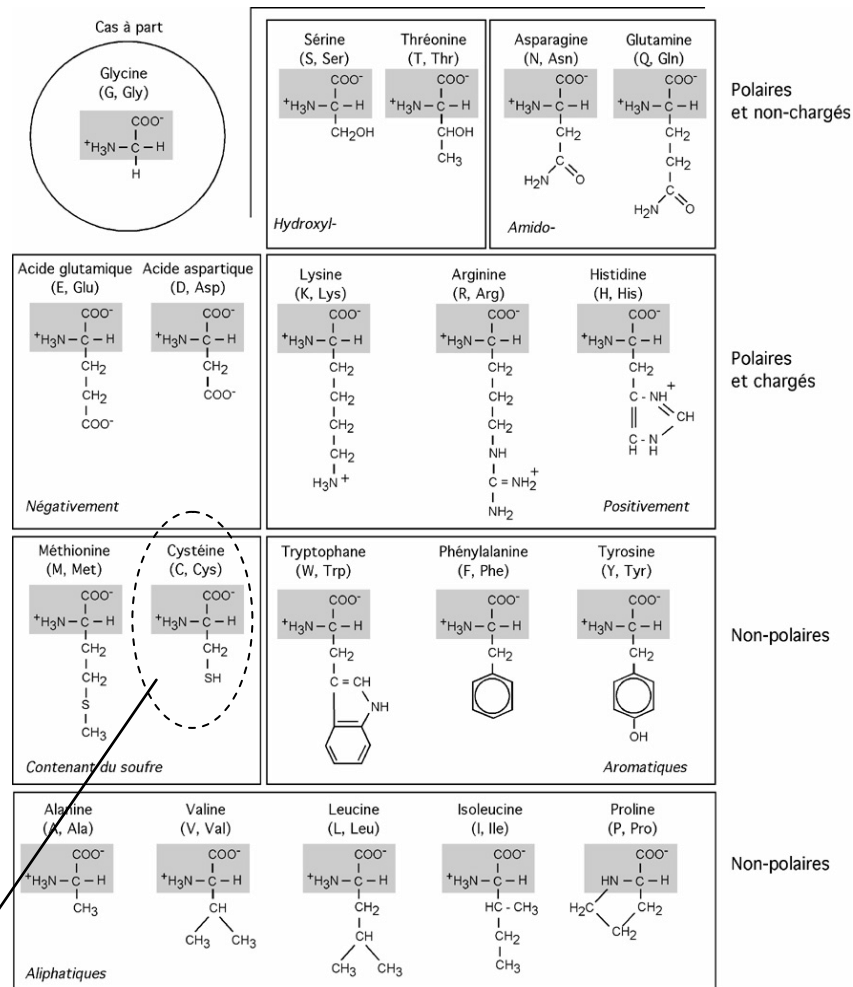


Figure 4 : Principaux acides aminés classés en fonction de leur polarité [49]

Exemple : La cystéine est acide aminé naturel sulfuré : groupement sulfhydryle (ou thiol R-S-H). Sa présence dans les protéines est très importante car elle permet la formation des ponts disulfures : ce sont des liaisons covalentes fortes qui, par oxydation, réunit les fonctions thiols de deux cystéines (Cystéine + Cystéine = Cystine). Cette liaison est nécessaire à la stabilisation de la structure de certaines protéines et sert de sites actifs dans le transport d'électrons.

2) Les protéines

a - Définition

Un peptide est l'élément de base d'une protéine, formé par l'enchaînement d'acides aminés reliés par liaisons peptidiques. L'ensemble de plusieurs peptides donne une protéine (figure 5). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient un grand nombre d'acides aminés (supérieur à 50) et de peptide pour des assemblages de petite taille.

Les protéines sont donc les macromolécules biologiques les plus abondantes et présentent une extrême diversité de structure et de fonction.

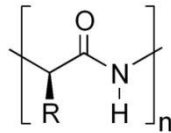


Figure 5 : motif de répétition d'une protéine [52]

b - Structure

On distingue quatre stades structuraux chez les protéines (figure 6). La structure primaire est un enchaînement successif d'acides aminés par la formation d'une liaison amide covalente : rigide et plane, sans rotation possible sauf autour des carbones α . Cette structure permet d'en déduire en partie la structure finale et la fonction. En effet, la modification de quelques acides aminés donne une fonction différente.

La structure secondaire correspond au 1^{er} degré de repliement de la chaîne. Elle présente différentes conformations dans l'espace telle que la structure dite en hélice α , où la chaîne polypeptidique se présente sous forme de spires régulières, stabilisée par des liaisons hydrogènes. Pour celle dite en feuillet β , les liaisons sont arrangées comme sur une feuille de papier pliée de façon régulière (donne une conformation étirée). On trouve aussi celle en coude β qui représente le repliement de 4 acides aminés, stable grâce à des liaisons hydrogènes. Enfin, lorsque la conformation locale d'un segment protéique ne correspond à aucune de ces structures secondaires, on dit qu'il adopte une conformation indéterminée.

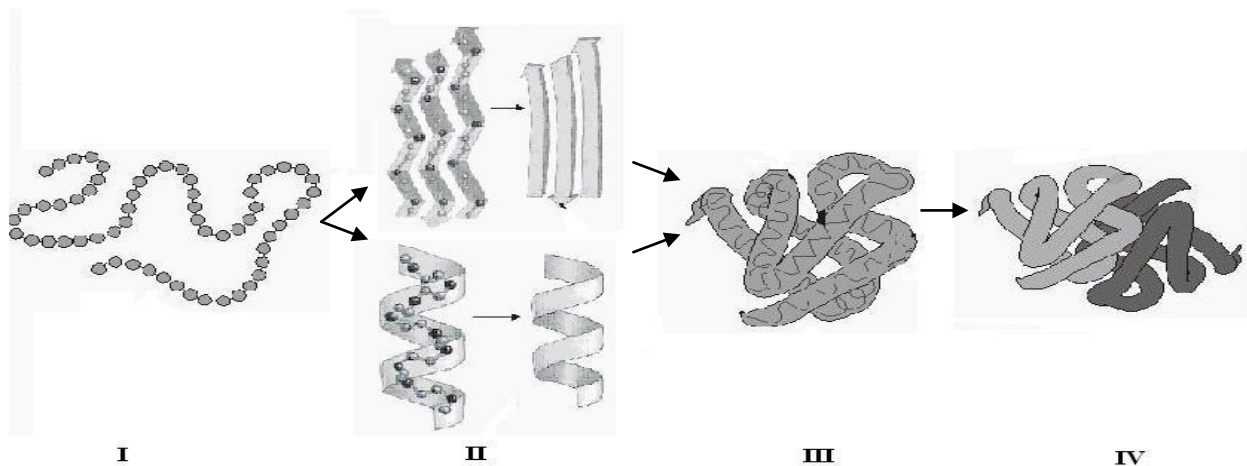


Figure 6 : Structure des protéines [37]

La structure tertiaire est le 2^{ème} degré de repliement de la chaîne. La structure est en 3D dans l'espace de la chaîne et dépend de la structure secondaire. Quant à la structure quaternaire, il s'agit d'un assemblage, lorsqu'il existe, de chaînes multimériques pour former la protéine définitive. On distingue selon la forme générale adoptée par la molécule les protéines globulaires* et les protéines fibrillaires*.

II - Le blanc d'œuf

1) Structure de l'œuf

Du fait d'une sélection intense depuis de nombreuses années, les œufs de poule aujourd'hui commercialisés ont un poids relativement constant de 60 g en moyenne (plus ou moins 5g). Les principales parties qui le constituent sont : le jaune ou le vitellus, le blanc ou l'albumen, les membranes coquillières et la coquille (figure 7).

Les proportions relatives de chacune de ses parties peuvent, en revanche, varier en fonction de divers paramètres (condition et durée de conservation des œufs...). En moyenne et en poids, la coquille représente environ 10%, le jaune 30% et le blanc 60% [42].

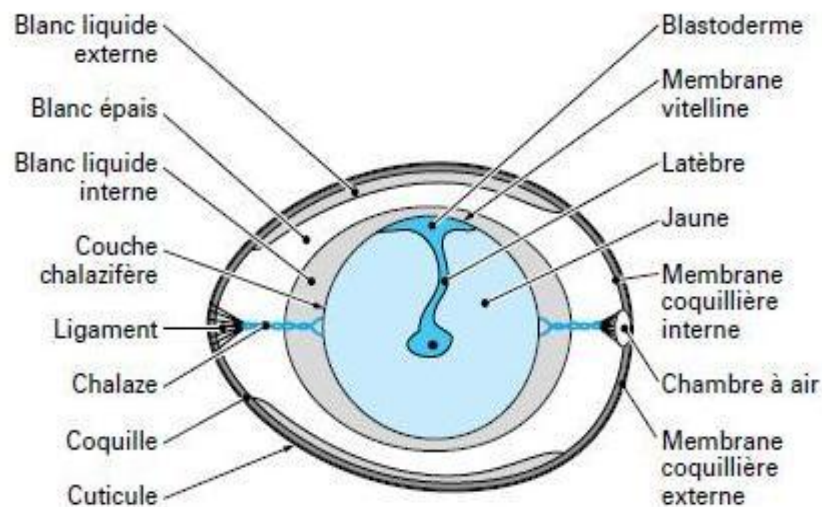


Figure 7 : Structure interne de l'œuf [66]

2) Composition du blanc d'œuf

Le blanc d'œuf n'est pas un milieu homogène, mais résulte de la juxtaposition de quatre zones distinctes (figure 7) :

- Blanc liquide externe en contact direct avec les membranes coquillières
- Blanc épais présentant l'aspect d'un gel
- Blanc liquide interne localisé entre le blanc épais et le jaune
- Chalazes : sorte de filaments spiralés allant du jaune vers les deux extrémités de l'œuf qui traversent le blanc épais et permettent de maintenir le jaune en suspension au milieu de l'œuf.

Le blanc d'œuf est composé en majeure partie d'eau (88%) et de protéines (10.6%), mais contient aussi des glucides (0.9%), des sels minéraux (0.5%) et quelques traces de lipides.

3) Les protéines du blanc d'œuf

Le blanc d'œuf peut être considéré comme une solution aqueuse de protéines globulaires dans laquelle baignent des fibres d'une glycoprotéine*, particulièrement abondante dans le blanc épais : l'ovomucine. Les protéines du blanc d'œuf ont été largement étudiées en raison de leurs nombreuses propriétés nutritionnelles, techno-fonctionnelles et biologiques. Malgré cela, la composition en protéines et notamment celle en protéines mineures n'est certainement pas complètement achevée puisque de nouvelles protéines viennent d'être mise en évidence dans le blanc d'œuf [56]. L'ensemble des protéines aujourd'hui répertoriées est présenté en annexe n°1. Nous allons donc décrire les principales protéines du blanc d'œuf.

a - L'ovalbumine :

L'ovalbumine est la protéine prédominante du blanc d'œuf : elle correspond à 54% de la fraction protéique. Il s'agit d'une phosphoglycoprotéine* de pHi 4,5 et de masse moléculaire 45 kDa. C'est une protéine globulaire qui comporte 385 acides aminés et sa température de dénaturation est de 84,5°C. Elle possède six cystéines dont deux sont liées pour former un pont disulfure. Chaque molécule d'ovalbumine possède 4 groupements thiols libres : trois d'entre eux sont faiblement réactifs et le quatrième peut réagir lorsque la protéine est dénaturée [54]. C'est la seule protéine du blanc d'œuf contenant des groupes S-H libres. De plus, elle est formée de trois feuillets β et dix hélices α . La moitié des résidus de l'ovalbumine est hydrophobe et un tiers des résidus est chargé, conférant un caractère acide à la protéine[55].

b - L'ovotransferrine

L'ovotransferrine est une glycoprotéine* qui appartient à la famille des transferrines fixant les ions métalliques et en particulier le fer. C'est également une protéine globulaire de 686 acides aminés, son poids moléculaire est de 77,7 kDa et représente environ 12% de la fraction protéique du blanc d'œuf. Son pHi de 6.5 est proche de la neutralité. De plus, elle comprend 31 hélices α et 6 feuillets β .

L'ovotransferrine est la protéine la plus thermosensible du blanc d'œuf, elle coagule entre 60 et 65°C.

c - L'ovomucoïde

L'ovomucoïde est une glycoprotéine* représentant environ 11% des protéines du blanc d'œuf. Sa masse moléculaire est de 25kDa, sa séquence comprend 186 acides aminés et son pI moyen est de 4,1. La molécule contient neuf ponts disulfures mais pas de groupements « thiol » libre. La molécule consiste en trois domaines reliés entre eux par des ponts disulfures.

d - Le lysozyme

Le lysozyme est une petite molécule de 129 acides aminés, de masse moléculaire 14,9 kDa présent en faible quantité dans le blanc d'œuf : 3,5%. Cette protéine globulaire est basique dont le pI de 10.7 est très éloigné de celui des autres protéines et sa température de dénaturation est de 71,5°C. Elle contient quatre ponts disulfures, lui conférant une structure très compacte et la rendant très stable [25]. La chaîne polypeptidique est reliée sur elle-même et les 40 premiers résidus du domaine N-terminal (groupe amine) forment un domaine globulaire très compact avec au centre un noyau très

hydrophobe coincé entre deux hélices alpha. Le second domaine (40-85) est plus hydrophile et le reste de la chaîne est principalement constitué de résidus hydrophobes [24].

e - L'ovomucine

L'ovomucine est une glycoprotéine sulfatée responsable de l'aspect visqueux du blanc d'œuf. Son pI se situe autour de 4,5 et c'est une protéine de très haut poids moléculaire (>200 kDa), constituée de plusieurs sous-unité (α et β) difficile à analyser. La séquence est constituée de 2086 acides aminés [42].

4) Les propriétés du blanc d'œuf

Les propriétés interfaciales des protéines, incluant le pouvoir moussant et émulsifiant sont des fonctionnalités particulièrement recherchées dans de nombreux produits alimentaires. Mais ce sont ses propriétés gélifiantes qui vont nous intéresser. En effet, le blanc d'œuf est un liquide visqueux transparent qui, après chauffage, prend l'aspect d'un gel blanc opaque. De plus, la qualité des gels dépendra des caractéristiques physico-chimiques des protéines (hydrophobie, charge...).

a - Définition d'un gel de protéine

Les gels sont considérés comme étant un état intermédiaire entre un solide et un liquide. Ils sont constitués de polymères reliés entre eux par des liaisons covalentes (pont disulfure, liaisons isopeptidiques...) ou non covalentes (liaisons hydrogènes ou de Van Der Waals...) pour former un réseau continu tridimensionnel.

b - Dénaturation des protéines

La dénaturation d'une protéine correspond à la désorganisation de la structure spatiale sans rupture des liaisons covalentes et en particulier des liaisons peptidiques, seules les liaisons secondaires sont concernées. La chaîne polypeptidique est alors partiellement ou totalement dépliée [15].

En effet, le blanc d'œuf est fortement concentré en protéines (10%) dans lequel ces dernières établissent entre elles des liaisons temporaires de faible énergie (interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes). L'absence de zone de contact de forte énergie entre les protéines réside dans le fait que les acides aminés hydrophobes et les groupements les plus réactifs sont majoritairement enfouis au cœur des structures et que l'effet de ceux localisés en surface est contrebalancé par la présence de groupements chargés et/ou hydrophiles s'opposant à l'établissement de zones de contact plus pérennes.

Dans le cas de la gélification, c'est l'énergie thermique apportée par le chauffage qui constitue la force motrice pour la formation du gel protéique (même s'il peut être couplé à des évolutions de pH ou de forces ioniques). L'énergie thermique induit des modifications dans la structure des protéines (= dénaturation) : dissociation des liaisons hydrogènes, déploiement des chaînes polypeptidiques, démasquage et exposition de résidus hydrophobes et de groupements réactifs enfouis au cœur des protéines à l'état natif [16].

III - Les plastiques dans l'emballage

1) Généralités

De plus en plus utilisées dans l'emballage, les matières plastiques se sont substituées aux matériaux traditionnels comme le papier, le carton, le verre, le métal. Elles sont très répandues grâce notamment à une grande variété de fonctions et à une certaine polyvalence dans le design. La diversité des caractéristiques offertes par les matières plastiques toujours associées à des adjuvants rend l'identification de ces matériaux souvent difficile.

Lorsque l'on parle de matières plastiques, il convient de définir lesquelles car elles ne possèdent pas toutes les mêmes caractéristiques mécaniques et physico-chimiques. Cependant, en les associant en couches successives (structure laminaire), on peut obtenir le matériau idéal si, toutefois, on a au préalable défini les performances souhaitées : perméabilité à l'eau, aux gaz, résistance mécanique, transparence ... Actuellement, ce type de matériau est discuté en raison des problèmes de recyclage qu'il génère.

Les films polymères couramment utilisés sont la pellicule cellulosique, les films en polypropylène, le polyéthylène, les polyamides... Le choix du film va donc dépendre du produit à emballer, du traitement que le produit subira après emballage (stérilisation, refroidissement...) et également du processus de fabrication de l'emballage.

Le domaine des Genêts utilise la technologie de cuisson dans l'emballage car elle possède de nombreux avantages : augmentation de la durée de vie, une meilleure qualité des produits, un meilleur rendement ... (figure 1)

2) Le Surlyn

Le surlyn est un thermoplastique ionomère* et est utilisé pour la production des œufs pochés au domaine des Genêts (figure 9). L'emballage réunit deux types de films : le film thermoformé est plus rigide car il doit résister à l'action mécanique de la machine alors que le film qui servira d'opercule est beaucoup plus souple. Le facteur, ici, qui permet de les différencier est l'épaisseur du film.

Il s'agit donc d'un copolymère fabriqué par copolymérisation de l'éthylène avec une faible quantité d'acide méthacrylique : EMAA ou *poly(ethylene-co-methacrylic acid)*. Son nom lui vient de la marque commerciale de la société Dupont de Nemours.

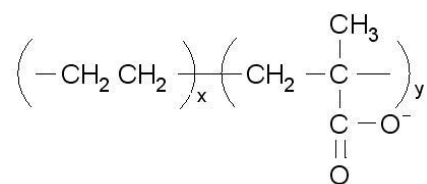


Figure 9 : formule chimique du surlyn [59]

Le groupement COO^- peut être neutralisé avec des cations tels que Na^+ ou Zn^{2+} par immersion dans une solution basique ou dans un mélange de base et de copolymère. Cette introduction de groupe ionique conduit à une modification des propriétés du polymère : morphologie, augmentation de la viscosité, dureté, propriétés d'adhésion... [59]

Son utilisation dans l'emballage s'explique par ses nombreuses propriétés physico-chimiques et mécaniques : aptitude au scellage (basse température de fusion), thermoformable, transparence, bonne résistance chimique aux graisses...

Des liaisons hydrogènes se forment entre les acides carboxyliques de la chaîne et des interactions électrostatiques apparaissent entre les ions et entre les composés non-polaires de la chaîne.

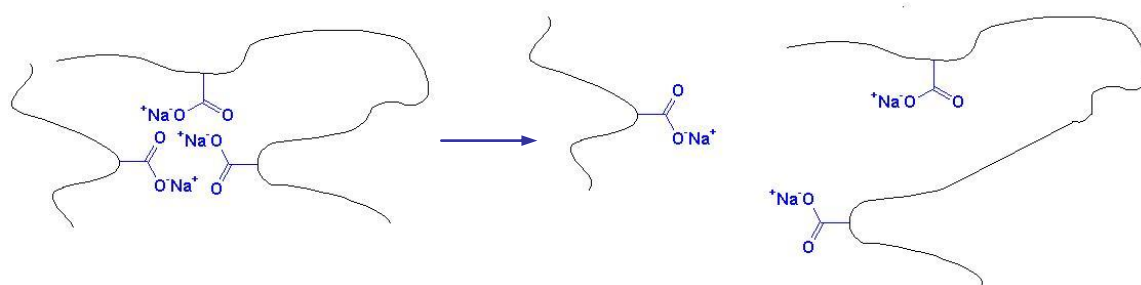


Figure 10 : comportement au chauffage [59]

Les groupes ioniques ont tendance à se regrouper mais lorsque l'on chauffe le plastique, ils perdent leur attraction (figure 10). Les chaînes sont donc plus libres et c'est ce paramètre qui explique que le surlyn peut être traité et moulé. En théorie, le surlyn est aussi utilisé car il est chimiquement inerte : il n'adhère pas aux produits qu'il contient : dans ce cas, il ne subit pas de traitement thermique au contact du produit. Dans notre étude, la cuisson des œufs pochés est réalisée dans le surlyn mais les protéines du blanc d'œuf adhèrent quand même à l'emballage.

On peut déjà en déduire quelques liaisons qui se mettent en place pendant le traitement thermique : des liaisons hydrogènes et ioniques, des liaisons hydrophobes ou encore des liaisons isopeptidiques dues à la présence du groupement acide.

Plusieurs chercheurs sont d'accord pour dire, qu'à 80°C , l'adhésion des protéines est plus importante avec le surlyn [1] [9] [10]. Malgré son excellente réaction au scellage, son utilisation est plutôt à éviter pour des produits cuits dans l'emballage. De plus, c'est l'un des polymères le plus cher sur le marché.

3) Les alternatives :

Bien que le sujet du stage s'oriente plus sur la compréhension et l'identification des interactions entre les protéines et les films plastiques, il est intéressant de se demander quel matériau pourrait remplacer le surlyn. Il est important de rappeler que pour éviter l'adhésion, les techniciens vaporisent un mélange d'huile, évitant ainsi tout contact entre les protéines et l'emballage, qu'ils souhaiteraient éliminer pour des raisons de réglementation.

D'après le cahier des charges, le polymère doit être thermoformable et doit pouvoir se sceller facilement. Ces deux propriétés sont prioritaires du point de vue de l'entreprise. La transparence semble être un facteur de choix, donc il faut favoriser les polymères plutôt amorphes, (voir certains semi-cristallins).

On peut déjà éliminer un des polymères dont les caractéristiques d'anti-adhérence sont très connues, le PTFE (polytétrafluoroéthylène) car son thermoformage est impossible. En effet, il a une viscosité dynamique très élevée à l'état fondu, ce qui exclut toute possibilité de mise en œuvre par les méthodes classiques des thermoplastiques. Mais il peut être utilisé comme additifs dans les plastiques (ex : poudres micronisées). D'autres polymères comme le PVC (poly (chlorure de vinyle)), le PC (polycarbonate), le PET (poly(éthylène téréphtalate)) , les PA (polyamides) sont aussi à éliminer car le scellage n'est pas possible. Il reste alors des polyoléfinés comme le PP, le PEBD, le PEBD linéaire et d'autres polymères tels que le PLA et autres polymères fluorés...

a - Revêtements anti-adhérents

Parmi les produits industriels actuellement disponibles sur le marché, deux groupes de polymères ont des propriétés intéressantes : les polymères halogénés (et en particulier les fluoropolymères) et les silicones (pas utile pour notre étude : servent plutôt pour des plats en cuisine...).

Les polymères fluorés sont connus pour leur faible coefficient de frottement et leur propriété anti-adhérente. Les plus importants fluoropolymères sont le PTFE (déjà cité ci-dessus), le poly(fluorure de vinylidène) (PVdF), représenté figure 11, le poly(fluorure de vinyle) (PVF) et divers copolymères comme les copolymères éthylène-propylène fluorés (FEP). Ils présentent tous une faible énergie de surface et sont souvent inertes chimiquement. Concernant leur alimentarité, la réglementation autorise l'utilisation de polymères si leurs monomères ou constituants de base sont autorisés et si leurs limites de migration sont respectées dans les conditions d'utilisation prévues.

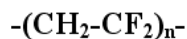


Figure 11 : représentation du PVdF [69]

Des recherches sont également menées sur les polymères capables de former un film biocompatible, tels le poly(éthylène glycol) ou PEG. Il est connu pour prévenir l'adhésion de bactéries et l'adsorption de protéines notamment sur les biomatériaux

b - Traitements de surface

Les traitements des polymères peuvent être classés en deux groupes : les modifications chimiques (le polymère est placé dans une espèce réactive liquide, solide et parfois gazeuse) et les modifications physiques (la surface est irradiée par un milieu possédant une énergie importante). Un troisième groupe aborde les modifications des propriétés de masse (cristallinité, composition) souvent utilisées dans la conception des mélanges de polymères [64]. On y retrouve par exemple les modifications chimiques avec les attaques humides, l'oxydation chimique ou la polymérisation par Plasma et les modifications physiques telles que le flammage, traitement Corona, Plasma, ou les faisceaux d'ions, d'électrons, de photons...

IV - Les mécanismes d'adhésion

1) Les liaisons chimiques

a - Généralités

Il existe plusieurs types d'interactions moléculaires telles que (figure 12):

- Van Der Waals (London, Debye, Keesom) : Longue portée (a.)
- Electrostatiques : longue portée (b^1 et b^2 .)
- Liaison Hydrogène : courte portée (c.)
- Liaisons chimiques (covalente, pont disulfure...) : courte portée (d.)
- Structurales (d'hydratation, hydrophobes, stériques...) (e.)

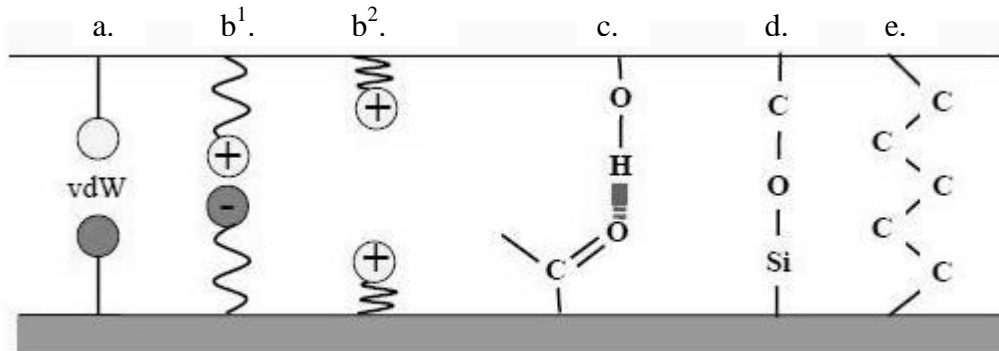


Figure 12 : les types de liaisons [60]

La liaison covalente est la liaison qui unit les atomes dans la molécule. On la définit comme une force résultant du partage d'un doublet d'électrons entre deux atomes. La liaison intermoléculaire est celle qui unit les molécules dans le solide. On la définit comme une force électrostatique s'établissant entre les dipôles des molécules.

Les interactions de Van der Waal résultent d'attractions interdipolaires et sont de trois types :

- Forces de Keesom : interaction de molécules possédant chacune un moment dipolaire permanent comme les groupements polaires tels que : $-NO_2$, $-Cl$, $-COOR$ -
- Forces de Debye : interaction entre un dipôle permanent et un dipôle induit
- Forces de London : interaction entre deux dipôles instantanés

La liaison hydrogène est une interaction électrostatique dipolaire (non covalente). Elle se développe entre un atome d'hydrogène porté par un atome fortement électronégatif (O, N) et un groupement polaire comportant un atome fortement électronégatif (F,N,O). Ces liaisons sont plus énergétiques que les interactions de Van der Waals car elles font intervenir des moments dipolaires* importants et surtout des distances interdipolaires faibles en raison de la petite taille des atomes mis en jeu, l'hydrogène en particulier.

La liaison ionique est l'attraction électrostatique des ions de charges opposées qui assurent la liaison de ces composés (liaison très forte) (figure 12 : b^1 .)

b - Dans une protéine

Les radicaux des acides aminés ont des propriétés chimiques différentes (figure 4). Certains sont hydrophobes, d'autres hydrophiles, certains s'ionisent négativement et d'autres positivement. Certains radicaux peuvent former des liaisons chimiques plus ou moins fortes avec d'autres radicaux. Il peut donc y avoir dans une chaîne d'acides aminés un certain nombre d'interactions entre les radicaux. Certains se repoussent et d'autres se rapprochent formant alors des liaisons chimiques (figure 13). La chaîne d'acides aminés aura donc tendance à se replier sur elle-même pour adopter une structure tridimensionnelle précise. Cette structure tridimensionnelle dépend avant tout de la séquence des acides aminés formant la chaîne.

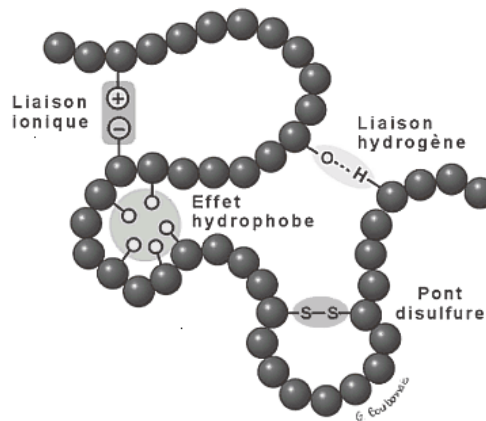


Figure 13 : Exemple de liaisons créées dans une protéine [51]

2) Généralités sur l'adhésion

a - Définition

L'adhésion correspond à l'ensemble des phénomènes physiques et/ou chimiques qui prennent naissance lorsque deux surfaces sont mises en contact. L'adhésion est liée à l'adhésivité*, à l'état de surface et à la mouillabilité*.

Les forces d'adhésion correspondent aux forces de cohésion des matériaux (figure 14): liaisons interatomiques (liaisons chimiques fortes) ou intermoléculaires (liaisons « physiques » faibles). Les énergies de liaison correspondantes sont donc très différentes.

Types de liaison		Energie de liaison (Kcal/mol)	Distance d'interaction (Å)
Inter-atomiques	Ionique	80 - 250	1,5 - 2,4
	Covalente	50 - 220	1,5 - 2,4
	Métallique	25 - 85	2,6 - 3,0
Inter-moléculaires	Hydrogène	2 - 10	2,6 - 3,0
	London	1 - 10	3 - 5
	Debye	1 - 5	3 - 5
	Keesom	~ 0,5	3 - 5

Figure 14 : Energie de liaison et distance d'interaction pour chaque type de liaisons

De plus, quelles que soient les forces d'adhésion, les interactions deviennent négligeables dès que la distance entre deux sites actifs est supérieure à 5 Å [60].

Le potentiel des interactions intermoléculaires correspond aux forces entre deux molécules qui sont soit répulsives (à courte distance), soit attractives (à longue distance).

On définit l'énergie potentielle d'interaction de la façon suivante : $-U = \frac{a}{r^m} - \frac{b}{r^n}$ (avec a: attraction et b : répulsion). On en déduit la force : $F = -dU/dr$

b - Les facteurs qui contrôlent l'adhésion

L'adsorption des protéines dépend de plusieurs paramètres :

→ Influence des paramètres extérieurs : la température, le pH et la force ionique sont des paramètres qui encouragent l'adhésion (cf § dénaturation des protéines).

→ Influence des propriétés des protéines : En effet, les protéines sont des biopolymères composées de 20 acides aminés naturels comme unités monomères. Ce sont des structures très complexes que l'on peut décomposer en domaine individuel présentant des propriétés spécifiques comme hydrophiles/hydrophobes, polaires ou non-polaires, chargés ou non-chargé... La conformation de la protéine, la distribution de sa charge et la force de ses liaisons intermoléculaires sont à prendre en compte.

→ Influence des propriétés de surface : Les interactions protéine-surface sont influencées par les propriétés des protéines mais aussi par les propriétés de la surface. Des paramètres importants comme l'énergie de surface, la polarité, la morphologie, la rugosité... doivent être considérés. Les protéines ont plutôt tendance à adhérer sur des surfaces apolaires, chargées et avec une tension de surface élevée. Belfort *et al* (2010) ont supposé que les surfaces apolaires déstabilisaient les protéines et ainsi facilitaient les réorientations de conformation conduisant à la formation de liaisons plus fortes [57]. Ce phénomène pourrait expliquer la constatation assez générale que les protéines ont plus d'affinité avec des surfaces hydrophobes. Une exception serait le cas des glycoprotéines, dont certaines sont présentes dans le blanc d'œuf, où l'adhésion serait plus forte sur des surfaces hydrophiles que sur des surfaces hydrophobes [58].

c - Thermodynamique de l'adsorption des protéines.

L'adsorption des protéines peut être décrite par une condition thermodynamique simple : il y aura adhésion si l'énergie libre de Gibbs diminue ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$) [2].

Un des paramètres les plus importants pour déterminer la variation de l'énergie libre et plus précisément son enthalpie sont les interactions électrostatiques. Celles-ci peuvent être attractives ou répulsives selon la charge des protéines et de la surface.

V - Les interactions protéines / films plastiques

1) Etat de l'art

De nombreuses études montrent l'énorme enjeu scientifique de définir les interactions protéines / surface. En effet, ces interactions jouent un rôle clé dans de nombreux domaines comme la médecine régénératrice, les médicaments, les implants, la technologie des biocapteurs ... Toutes ces applications biotechnologiques sont aussi liées à des effets indésirables comme l'encrassement du matériel par adsorption de protéine d'où l'intérêt de comprendre ce phénomène d'adhésion dans le but de l'éviter [23] [25]. Dans l'industrie pharmaceutique, en biologie avec les membranes, l'adsorption des protéines sur les surfaces posent de gros problèmes car la fonction initiale des médicaments cibles encapsulés par exemple peut être stoppée nette et les avancées technologiques et scientifiques freinées [4]. Nous comprenons bien ici l'importance d'éclaircir ce phénomène.

Jusqu'à présent, les mécanismes d'adhésion entre le blanc d'œuf et les différents films plastiques n'ont pas été étudiés. C'est pourquoi, nous avons axé nos recherches sur l'adhésion des protéines en générale (lait, jambon, poulet, poisson, plasma sanguin...) car elles sont sensiblement les mêmes.

La technique « Cook in the film », autrement dit cuisson dans l'emballage, a été étudiée par Clardy Rosinski *et al.* Il en ressort qu'en fonction du type de viande, l'adhésion recherchée sera différente [1]. En effet, pour du jambon, il faut prévoir une bonne adhésion pour éviter une poche/perte de fluide entre le produit et le film d'emballage, alors qu'une cuisse de poulet exige une faible adhésion de l'emballage pour empêcher la séparation de la peau et de la viande lors du retrait du film [9] [10]. Le type de viande détermine donc le degré d'adhésion du film plastique. Si le but est de minimiser la quantité de résidu sur le film, le PP se révèle être le plus intéressant. Ils ont aussi remarqué que si la viande est congelée avant d'être emballée, il n'y a pas d'adhésion et ce pour n'importe quel film plastique.

Des nombreuses études se sont orientées sur l'influence de certains paramètres comme le niveau de vide dans l'emballage, la concentration en sel (NaCl, phosphate)... En effet, si on augmente le vide, la quantité de protéines adsorbée diminue alors que l'ajout de sel, jusqu'à 2,5% augmentera la quantité la protéine présente sur les films plastiques [10] [13]. Briand et Belfort ont testé plusieurs facteurs (mouillabilité, tension de surface) et deux protéines (ribonucléase et de l'albumine de sérum humain) sur des films d'acétate de cellulose. Ils ont ainsi montré que la mouillabilité semblait être un paramètre négligeable pour l'adhésion [3] A l'opposé, Sethuraman *et al* indiquent qu'il y a une relation entre l'adhésion et la mouillabilité [7]. D'autres affirment que la rugosité n'influence pas du tout l'adhésion [11].

Belfort montre, par la même occasion, que l'albumine, se dénaturant très facilement, favorisait la création de liaisons fortes avec l'acétate de cellulose qui a une surface plutôt hydrophile [4]. Xu et Siedlecki se sont focalisés sur un type de protéines, la fibrinogène (glycoprotéine* du plasma sanguin), et ont utilisé la microscopie de force atomique pour comprendre les interactions avec des surfaces chimiquement différentes. Ils ont conclu en disant que cette protéine a tendance à s'adsorber sur des surfaces plutôt hydrophobes [6].

Plus récemment, les recherches se sont tournées sur les moyens d'éviter l'adsorption des protéines sur les surfaces. Des scientifiques danois ont fait une étonnante découverte : ils ont trouvé un moyen assez simple de réduire l'adsorption des protéines (fibrinogène et albumine) en enduisant sur différentes surfaces (acier inoxydable, or, polystyrène) une solution aqueuse de protéines de poisson [8]. Quelle que soit la surface, métallique plutôt hydrophile, PS plutôt hydrophobe, les protéines de poisson peuvent éviter l'adsorption par répulsion stérique. Inoue *et al*, Quant à eux, ont proposé les caractéristiques idéales pour empêcher ce phénomène d'adhésion : le matériau doit être hydrophile, doit contenir des liaisons H accepteurs et doit être électriquement neutre [21]. L'une des conditions importantes est que le polymère ne doit pas contenir de liaisons H donneur, sinon il y aura adhésion. Le PEG, poly(éthylène glycol), a alors intéressé beaucoup de chercheurs car il est connu pour ses caractères anti-adhérent et biocompatible (figure 15):

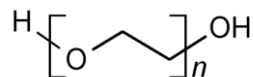


Figure 15 : Représentation chimique du PEG

Gon et Santore démontrent que les interactions électrostatiques jouent un rôle important dans l'adsorption des protéines [20]. Cette étude montre comment ils ont réussi à greffer des « patchs » de polymères brossés (copolymère PLL-PEG) à la surface de plaquette de silicium (figure 16) dans le but de contrôler l'adsorption :



Figure 16 : état de surface : cationique = patch de PLL saturé (poly-L-lysine) ; surface anionique : Silicium nu ; surface brossée = copolymère PLL-g-PEG [20]

Les interactions électrostatiques entre les surfaces cationiques et les régions plutôt négatives des protéines sont énergiquement insuffisantes pour créer des liaisons. De plus, ils montrent qu'il existe un seuil d'adhésion : si la surface est totalement ou partiellement brossée de PLL-g-PEG, il n'y a pas d'adhésion (répulsions stériques) alors que si on augmente la concentration des patches en PLL, il y a adhésion (interactions électrostatiques). Les résultats de l'étude de Malzert-Fréon *et al* corroborent avec l'idée que l'adsorption des protéines (et du lysozyme en particulier) sur des films en PLA modifié par du PEG dépend du pourcentage de PEG introduit [23].

Une étude sur les mesures d'angles de contact préalablement réalisée par l'ancien directeur du Domaine des Genêts a montré que le lysozyme est capable d'échanger des interactions attractives de type Van der Waals et Lewis acide-base avec le film testé : le surlyn. Ainsi pour limiter l'adhésion du lysozyme à la surface des polymères, il semblerait qu'il faille les rendre hydrophobes et apolaires [47].

Nous comprenons ici que l'adhésion est un phénomène très complexe et que de nombreux paramètres sont en jeu. Il faut néanmoins prendre toutes ces données avec recul car dans la majorité des études réalisées, les protéines sont dans leur état natif ou alors ne sont pas dénaturées par la chaleur. En effet, la température n'aura pas la même influence qu'une variation de pH ou qu'une augmentation de la concentration en sel... Mais, il y a des pistes à suivre.

2) Les méthodes de caractérisation

Grâce à une intensification des recherches sur les interactions des protéines avec la surface, différentes techniques (de l'échelle micro à la nano) ont été développées pour les étudier.

Le marquage des protéines avec des radio-isotopes ou des sondes fluorescentes, les dosages colorimétriques et la microbalance à cristal de quartz ont été les premières techniques utilisées pour suivre les cinétiques d'adsorption isotherme des protéines alors que l'appareil à force de surface (SFA) a été utilisé pour mesurer les forces d'interaction entre les couches de protéines à l'échelle micro.

Récemment, des techniques plus élaborées comme la fluorescence à réflexion interne totale (TIRF), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), résonance plasmonique de surface, la spectroscopie Raman, l'ellipsométrie*, SFA (à l'échelle nano)... ont été appliquées pour étudier la densité des protéines, la structure ou l'orientation au niveau des interfaces. Cependant, un tournant dans l'étude des interactions des protéines a été l'invention et l'utilisation à grande échelle de la microscopie à force atomique (AFM), qui peut à la fois imager les molécules sur les surfaces et qui est aussi capable de mesurer directement les forces d'interaction.

a - Les techniques pour étudier l'adsorption des protéines

L'étude des interactions protéine/film plastique a été améliorée avec l'application de la fluorescence à réflexion interne totale (TIRF) [20]. Cette technique très précise utilise des ondes évanescentes générées par des ondes incidentes réfléchies vers le substrat. En effet, pour un certain angle d'incidence, la lumière est totalement réfléchie à l'interface et permet d'examiner une branche très fine d'un échantillon. Après excitation, les fluorophores* présents dans les tryptophanes (acides aminés) émettent et absorbent à des longueurs d'onde bien précises et nous indiquent la présence ou non de protéine sur le substrat [31] [32].

La spectrométrie infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) apporte plus d'informations sur la structure des protéines à l'interface [2] [5]. Les spectres obtenus comporteront une bande entre 1600 et 1700 cm^{-1} caractéristique de la fonction amide, si les protéines ont été adsorbées à la surface (analyse quantitative). De plus, il est possible de déterminer quelle protéine est présente. Dans notre cas, le lysozyme et l'ovalbumine émettent souvent avec une intensité différente ce qui permet de les dissocier.

La spectrométrie photoélectronique par rayons X (XPS) est basée sur la détection d'éléments et de leurs configurations grâce à l'énergie de liaison fournie par les électrons émis lorsque l'échantillon est irradié par rayons X [44]. Sa capacité de détection est limitée à une profondeur de quelques nanomètres. XPS est donc une technique difficile, non seulement pour l'étude des biomolécules aux interfaces, mais aussi pour la caractérisation des modifications chimiques des surfaces des biomatériaux. L'élément attestant l'existence de protéines à la surface est généralement de l'azote, mais certains oligo-éléments, comme Fe, P, ou S, peuvent être utilisés dans le même but, lorsque leur concentration dépasse la détection XPS limite [53].

Remarque : La résonance plasmonique de surface : une technique à envisager

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du faisceau toute la lumière peut être réfléchi. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Si une fine couche de métal, riche en électrons libres est déposée à l'interface, ceux-ci entre en résonance avec les photons du faisceau incident : ce phénomène est appelé « Résonance plasmonique de surface ». Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé, présente une chute d'intensité à un angle défini. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent [30]

C'est sur ce principe que fonctionne le Biacore (figure 17). Il a pour fonction de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules dans un débit continu de tampon.

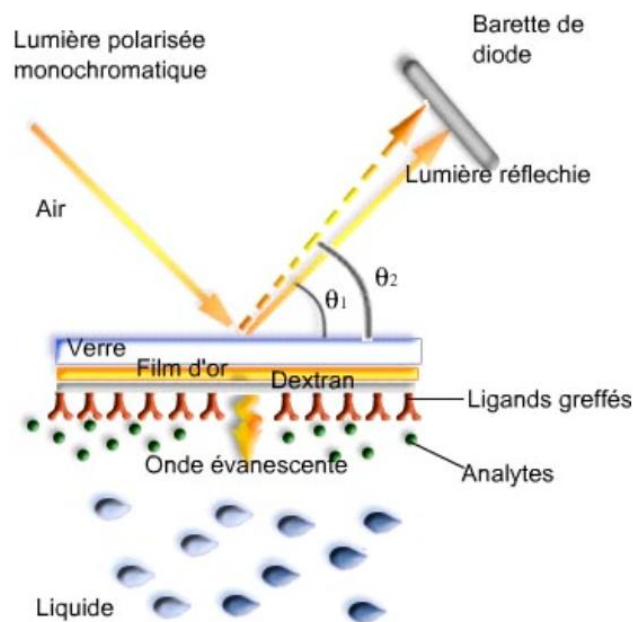


Figure 17 : principe de fonctionnement du Biacore [30]

Cette technique est principalement connue pour mesurer les forces de fixation d'un « récepteur » adsorbé sur un « ligand » à la surface d'une couche métallique. On pourrait imaginer placer un film plastique à la surface et faire passer en solution des protéines du blanc d'œuf. Il faudra néanmoins se soucier de la viscosité du blanc d'œuf (il ne passe pas dans les canaux), une dilution sera sans doute à envisager. Si l'on étudie les protéines seules en solution, il n'y aura pas de problèmes.

b - Les techniques pour mesurer les forces d'interactions

En plus de la mesure de l'adsorption des protéines, on peut obtenir des informations sur les interactions protéine-matériaux en mesurant la force d'adhésion ou de détachement à l'interface.

Le test de pelage, aussi appelé test d'adhésion, est principalement utilisé pour analyser des adhésifs. Le principe est le suivant : il s'agit de tirer sur un adhésif ou autre, dans notre cas un film plastique, collé à un substrat (blanc d'œuf) et de mesurer la force nécessaire au décollage ainsi que l'énergie totale dépensée (énergie d'adhésion) [9] [10] [13].

Une autre technique utilisée dans cet objectif est l'appareil à force de surface (SFA) [2]. Il mesure la force d'interaction entre deux surfaces (figure 18). Dans une expérience typique de SFA, les deux surfaces utilisées sont, par exemple, des feuillets de mica préparés par clivage, donc lisses à l'échelle moléculaire, puis collés sur des lentilles cylindriques, montées en regard dans l'appareil avec leur génératrice croisée. Quand les deux surfaces sont amenées au contact, celui-ci se fait en un point. Sous l'effet d'une charge normale de compression ou d'une adhésion, le film de colle entre les lentilles cylindriques et les feuillets de mica se déforme élastiquement. Le contact ponctuel devient alors un contact plan. C'est une technique d'interférométrie optique qui est utilisée pour mesurer à la fois la séparation entre les deux surfaces, les rayons de courbure locaux R autour du contact et le diamètre du contact circulaire. Cette méthode optique permet de connaître à l'angström près la séparation entre les deux surfaces [4]. On peut trouver cet appareil principalement au CNRS (Bordeaux, Lyon et Paris).

Dans notre cas, on peut imaginer fixer le film plastique sur les lentilles cylindriques, venir placer le blanc d'œuf sur une des surfaces, compresser et observer la force en fonction de la distance de séparation des lentilles.

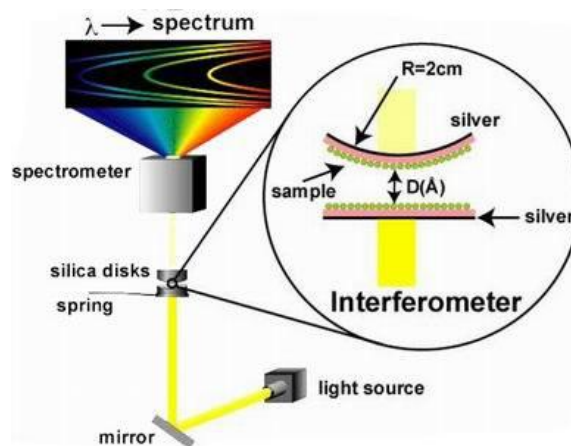


figure 18 : principe de fonctionnement d'une SFA

Bien que toutes les techniques décrites ci-dessus contribuent de manières significatives à l'étude des interactions interfaciales protéines/polymère, c'est l'invention de l'**AFM** qui a fait progresser la recherche dans ce domaine. La microscopie à force atomique est utilisée en imagerie pour représenter les protéines adsorbées à la surface et est aussi utilisée pour mesurer les forces d'interactions entre la pointe et la surface (avec une résolution de l'ordre du piconewton). La détection de la force d'interaction interatomique se fait par l'intermédiaire d'un ressort à l'extrémité duquel se

trouve la pointe. La pointe de l'AFM est alors modifiée avec une sphère colloïdale, sur laquelle une couche de protéine est immobilisée [14]. La force d'interaction à l'approche ou à la rétraction de la pointe de la surface est calculée en multipliant la déviation du cantilever avec son ressort constant (grâce à une méthode optique). L'influence des interactions pointe-surface sur la déflexion du ressort est représentée à la figure 19 :

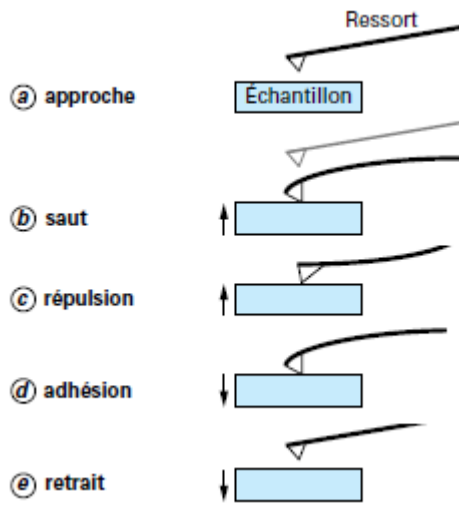


Figure 19 : déflexion du ressort [65]

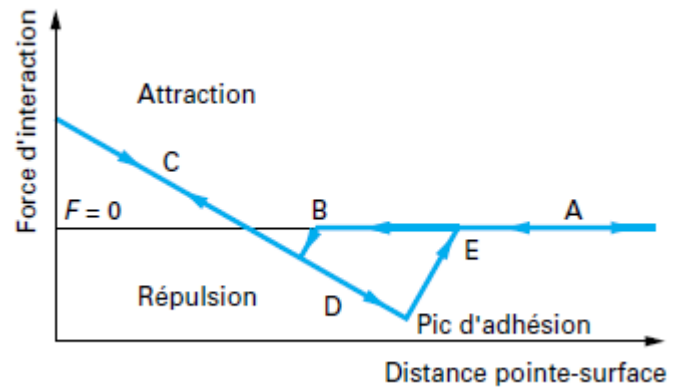


Figure 20 : force d'interaction en fonction de la distance pointe-force [61]

Si l'on considère la figure 20 qui représente la variation de la force d'interaction en fonction de la distance pointe-surface, dans la position A, l'échantillon se trouve à grande distance de la pointe : le ressort ne subit aucune déflexion car la force d'interaction est nulle. Quand on approche l'échantillon à une distance de l'ordre de 10-100 nm de la pointe, le ressort est alors soumis aux forces de longue portée telles que les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques ou magnétiques. Sous l'effet des forces attractives de Van der Waals par exemple, le ressort va se courber vers la surface. Si on continue de déplacer verticalement l'échantillon vers la pointe, on observe un saut brusque de la pointe vers la surface (position B) quand l'ensemble pointe-surface se trouve dans l'air, ce qui est généralement le cas. Dans l'air, la surface est recouverte d'un mince film d'eau (d'épaisseur comprise entre 2,5 et 50 nm suivant le taux d'humidité ambiant) et la pointe est soumise aux forces attractives de capillarité (d'intensité égale à 10–8 N). Une fois la pointe au contact de la surface, si on continue de déplacer l'échantillon vers le haut, la courbure du ressort va progressivement changer de signe ; dans la position C, l'interaction interatomique pointe-surface est répulsive et le ressort se courbe vers le haut. Si, maintenant, on éloigne l'échantillon de la pointe, on constate que la pointe adhère à la surface (position D) et que le ressort est courbé vers la surface. Cette adhésion a deux origines : la force adhésive entre la pointe et la surface et la force de capillarité. Si on continue d'éloigner l'échantillon, la pointe va alors quitter brusquement la surface et la déflexion du ressort devient nulle (position E). Le scénario précédent montre clairement que la nature attractive ou répulsive de la force exercée sur la pointe influe sur le sens de déflexion du ressort : en mesurant la déflexion du ressort, on peut donc atteindre la valeur de la force qui agit sur la pointe [3] [6] [21].

Partie B

Expérimentation

I - Matériels et méthodes

1) Les œufs

Pour toutes les manipulations réalisées, les œufs provenaient du commerce. Avant chaque expérience, nous avons préparé une quantité suffisante de blanc d'œuf (cassage manuel) puis nous avons passé au « Turrax » le blanc d'œuf pendant 5 minutes, c'est-à-dire que nous l'avons rendu homogène (mélange du blanc liquide et du blanc épais) pour faciliter la mise en œuvre.

2) Les polymères

Les films plastiques que nous avons testés lors de nos manipulations nous ont été donnés par le fournisseur «Sealed air SAS » du domaine des Genêts. Les différents films sont les suivants : Surlyn inférieur (qui subit le thermoformage), voir partie A § 2, surlyn supérieur (servant pour l'opercule), du polypropylène (PP), du polyéthylène basse densité (PEBD ou LDPE) et du polyéthylène basse densité linéaire (PEBDl ou LLDPE).

Le PP, PEBD et PEBDl appartiennent à la famille des polyoléfines. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont sensiblement les mêmes : apolaire, hydrophobe, semi-cristallin (mais transparent), thermoformable et thermoscellable (figure 21).

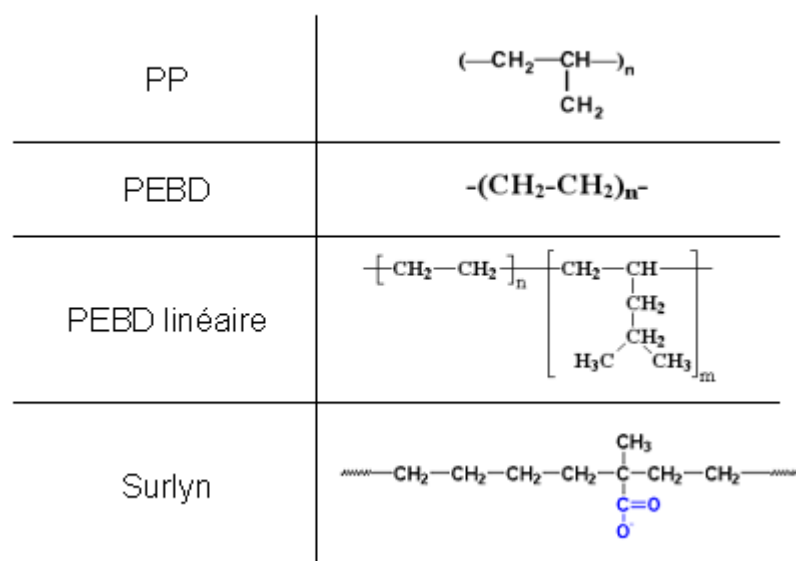


figure 21 : représentation chimique des polymères

3) Outils utilisés

Nous avons réalisé plusieurs séries de tests pour essayer de comprendre ce qui se passe à l'interface entre le film plastique et les protéines du blanc d'œuf, et de ce fait pouvoir en déduire quelles liaisons chimiques se forment lors de la cuisson des œufs pochés.

a - Fluorescence : protocole

Dans un premier temps, nous avons voulu voir dans quel cas il y a adsorption, autrement dit ce qui se passe à la surface des films plastiques. C'est pourquoi nous avons utilisé la «fluorescence frontale». Le principe de cette technique repose sur la fluorescence du tryptophane. C'est un acide aminé, aromatique, apolaire et hydrophobe, présent dans la plupart des protéines. L'une de ses caractéristiques essentielles est qu'il absorbe à 280 nm et émet à 340nm. Pour chaque échantillon, nous avons pu déduire la présence ou non de protéines.

Pour chaque film plastique, nous avons découpé 3 morceaux de taille égale (environ 4cm / 4cm). De plus, le mode frontal a été utilisé. Pour ce faire, nous avons fixé avec des trombones les films directement sur la cuve en vérifiant que les films étaient bien positionnés (à plat). Pour chaque échantillon, le spectre obtenu représente une moyenne de 3 scans. Nous avons donc réalisé deux séries de manipulation :

Manipulation n°1 : - Blanc d'œuf déposé directement sur les films plastiques

- 1^{ère} analyse
- Rinçage à l'eau, séchage pendant 24h puis 2^{ème} analyse

Manipulation n°2 - blanc d'œuf directement déposé sur les films plastiques

- **Cuisson à l'étuve (90°C / 1h)**
- 1^{ère} analyse
- Rinçage à l'eau, séchage pendant 24h puis 2^{ème} analyse

Remarque : L'intérêt du rinçage est d'« éliminer » le blanc d'œuf qui adhérerait par des interactions faibles.

Les deux modes « Emission » ont été utilisés et voici la méthode suivie :

- Matériel : LS 50B luminescence spectroscopy
- Logiciel : FL WinLab
- Méthode : champ de l'étude compris entre 290 et 450 nm, excitation à 295 nm, une largeur de fente de 2.5 nm et une vitesse de scan de 75 nm/min

b - Traction : protocole

Ensuite, à l'aide d'un rhéomètre, nous avons réalisé des mesures de forces normales entre le film plastique et le blanc d'œuf. L'avantage, ici, d'utiliser le rhéomètre, est que nous avons pu reproduire le processus industriel en chauffant puis en refroidissant le blanc d'œuf. Les protéines se trouvent alors dénaturées rendant l'expérience plus réaliste.

Nous avons mis au point une méthode qui permet à la fois de placer le film plastique au contact du blanc d'œuf, de chauffer le blanc d'œuf ainsi que de le refroidir, puis de tirer sur le film et d'en déduire la force normale nécessaire pour séparer le film du blanc d'œuf.

Avant chaque manipulation, il faut régler certains paramètres de l'appareil (inertie du moteur...). De plus, il est important de configurer le zéro de l'appareil sinon les résultats seront faux. Avec du scotch double-face, nous disposons le plastique sur la géométrie (6cm) ainsi qu'une coupelle en Alu sur le plan Peltier où nous verserons par la suite le blanc d'œuf.

→ *Création de 3 méthodes* (WorkBook) :

La 1^{ère} est la mise en place du plastique au contact du blanc d'œuf. Pour chaque échantillon, nous appliquons la même contrainte, c'est pourquoi nous avons défini la force maximum d'enfoncement dans le blanc d'œuf à $F = 15 \text{ mN}$ ($T_{\text{cste}} = 20^\circ\text{C}$). La manip s'arrête une fois cette force atteinte.

La 2^{ème} est la création de rampes de température. En effet, pendant le process industriel, le blanc d'œuf subit des variations de température à l'intérieur du plastique, nous avons donc créé une méthode s'en rapprochant le plus : rampe : 20°C à 90°C ($4^\circ\text{C} / \text{min}$), maintien : 10 min à 90°C , rampe n°2 : 90°C à 4°C ($4^\circ\text{C}/\text{min}$)

La 3^{ème} correspond à la traction. On tire sur la géométrie avec une vitesse de $50\mu\text{m/s}$ à une température constante de 4°C . Les courbes obtenues sont représentées sont en annexe n°2.

- Matériel : rhéomètre MCR 301
- Logiciel : rhéo-Plus
- Géométrie : Plan - Plan 6 cm

II - Résultats et discussion

1) Fluorescence

a - Sans cuisson et après rinçage

La figure 22 représente les spectres d'émission de trois films de Surlyn (n°1, n°2, n°3), découpés aléatoirement, que nous avons passé sans blanc d'œuf dans un premier temps. Ensuite, nous avons déposé du blanc d'œuf sur les films (Surlyn n°1 + BO...). Les films numérotés sont respectivement les mêmes avec ou sans blanc d'œuf.

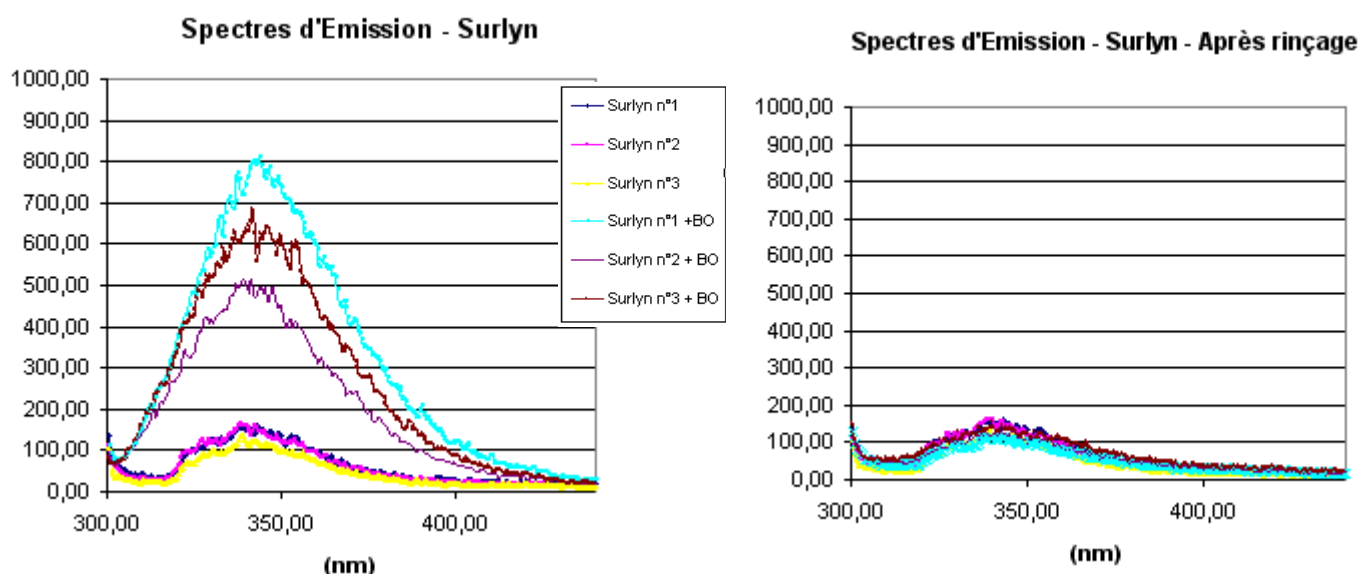


figure 22 : spectre de fluo du Surlyn inférieur avec blanc d'œuf directement déposé (gauche) et après rinçage(droite)

Pour tous les films testés, l'intensité des pics après le rinçage a fortement diminuée. Nous pouvons penser que le rinçage a permis l'élimination du blanc d'œuf qui n'est donc que faiblement adsorbé sur le film plastiques. Les protéines du blanc d'œuf, à l'état natif, interagissent très peu avec les films plastiques.

b - Avec Cuisson et après rinçage

Dans cette partie, nous avons voulu observer l'influence de la cuisson sur l'adhésion des protéines sur les films plastiques ainsi que l'effet du rinçage.

La figure 23 représente les spectres d'émission d'un film de LLDPE (bleu foncé) qui servira de référence d'une part et de trois films de LLDPE avec du blanc d'œuf cuit (n°1, n°2, n°3) d'autre part. Nous remarquons une perte d'intensité après la cuisson alors qu'après le rinçage (puis le séchage), l'intensité des spectres a augmentée.

Nous observons le même comportement pour les films de surlyn. (pas montré ici)

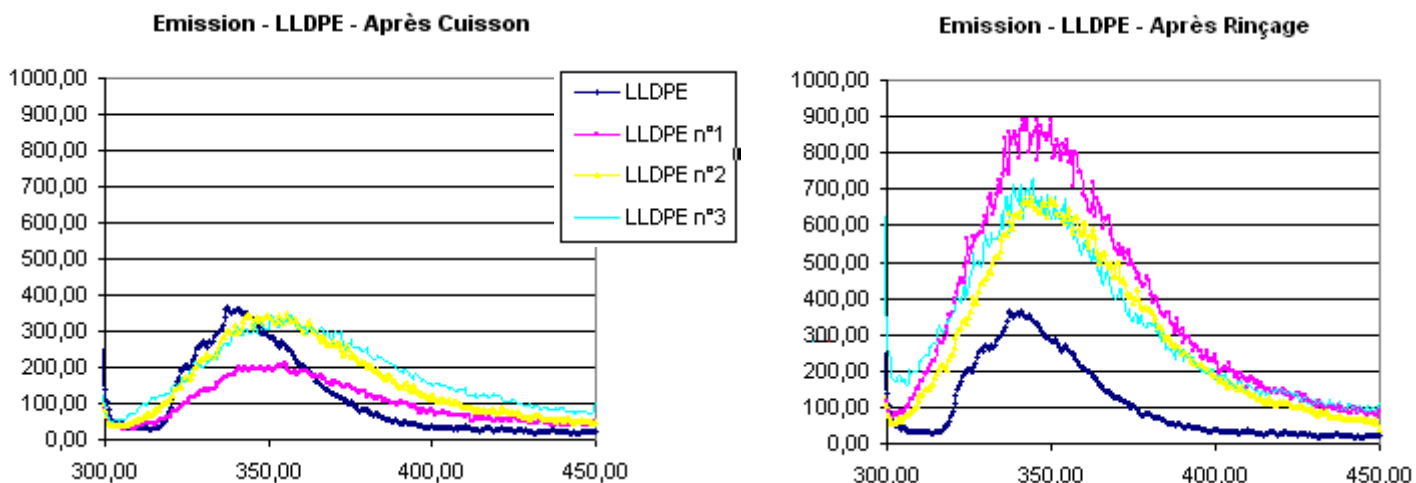


Figure 23 : spectre de fluo du LLDPE après cuisson (gauche) puis après le rinçage (droite)

La figure 24 représente les spectres d'émission du LDPE pur d'une part (la référence en bleu foncé) et ceux des trois films plastique avec le blanc d'œuf cuit (n°1, n°2, n°3).

Nous remarquons le même phénomène après la cuisson, l'intensité est très faible. Par contre, le rinçage ne semble pas avoir d'influence pour ce type de film. Les spectres correspondants au PP sont très proches de ceux obtenus avec le LDPE (pas montrés ici).

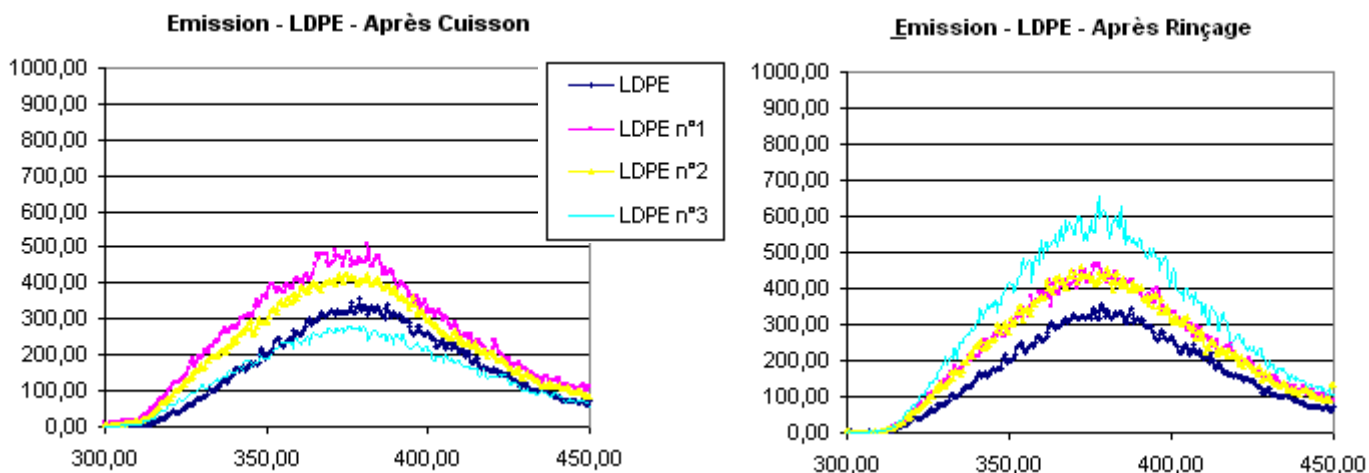


Figure 24 : spectre de fluo du LDPE après cuisson (gauche) puis après le rinçage (droite)

D'après la figure 24 (après le rinçage), l'intensité du pic caractéristiques des protéines n'a pas ou très peu évoluée contrairement au spectre représentant le LLDPE (figure 23 après rinçage) où l'intensité a ré-augmenté comme s'il n'y avait pas eu de cuisson.

D'une manière générale, pour les spectres obtenus juste après la cuisson, les pics caractéristiques des protéines (340 nm) sont légèrement décalés (environ 360nm). Ce décalage peut s'expliquer car il correspond aux protéines dénaturées qui n'émettent pas aux même longueurs d'onde. (λ augmente, l'énergie diminue \rightarrow proton plus exposé = protéine dénaturée)

Ensuite, nous observons deux types de comportement. Pour le PP et le LDPE, après la cuisson et le rinçage, les résultats sont semblables à la première manipulation. L'intensité du pic caractéristique des protéines n'a pas évoluée au cours des divers traitements. Le changement d'état des protéines ne semble pas influencer l'adsorption sur ces films plastiques.

Pour le LLDPE et les deux types de Surlyn, nous observons une « réapparition » des pics après le rinçage alors qu'ils n'étaient pas présents après la cuisson. Cette différence d'intensité peut s'expliquer par la nature du milieu (milieu sec juste après la cuisson) alors qu'après le rinçage, les protéines se sont réhydratées. Les interactions entre les protéines du blanc d'œuf et ces deux films plastiques sont donc bien présente : on en déduit qu'il y a eu adhésion.

Remarque : les spectres obtenus en excitation sont en accord avec ceux obtenus en émission

2) Traction

Pour chaque type de plastique, nous avons réalisé deux manipulations en prenant le soin de changer le morceau de plastique à chaque fois ainsi que le blanc d'œuf. Les méthodes suivies sont assez lourdes mais c'est la dernière partie qui va nous intéresser, la traction. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°1 ci-dessous :

	n°1	n°2	F (N)	Ecart type
PP	0,32	0,48	0,40	0,17
LDPE	0,52	0,60	0,56	0,08
LLDPE	13,95	15,21	14,58	1,26
Surlyn Sup	21,95	20,22	21,09	1,73

Tableau n°1: force normale des différents films polymères

Nous remarquons qu'en fonction du type de plastique, les valeurs obtenues sont différentes. Nous pouvons dire qu'il y a deux comportements bien distincts. Pour le PP et le LDPE, la force normale obtenue est très faible, inférieure à 1 Newton alors que si nous nous focalisons sur le LLDPE et le Surlyn (opercule), la force normale est très élevée, d'ordre de grandeur différentes (>15N). Nous en déduisons que l'adhésion entre les protéines du blanc d'œuf et ces deux films plastiques est bien plus importante que pour le PP et le LDPE. Dans la littérature le PP et le LLDPE sont considérés comme des polymères non-adhérent [46], mais ces expériences montrent que, dans le cas du blanc d'œuf le LLDPE est plutôt un polymère adhérent. Ce paramètre pourrait s'expliquer par ses ramifications (groupement méthyle $-CH_2$, $-CH_3$) qui ont la possibilité de créer un grand nombre de liaisons hydrogènes.

Maintenant, si nous croisons ces résultats avec ceux obtenus en fluorescence, les résultats sont en accord et il en ressort deux groupes :

- PP et PEBD : polymères peu adhérents aux protéines
- LLDPE et surlyn : polymères très adhérents

III - Suite des expériences

Jusqu'à présent, nous nous sommes concentrés principalement sur des recherches bibliographiques et sur de la mise au point de méthodes. Ces premiers résultats nous ont aidés à mieux comprendre et à appréhender le phénomène d'adsorption des protéines sur les films plastiques. En fluorescence, ils nous informent juste sur la présence ou non de protéines sur les films plastiques, nous ne comprenons pas ici les mécanismes d'adhésion.

C'est pourquoi, dans la suite du stage, nous allons poursuivre les expériences dans le but de comprendre ce qui se passe à l'interface et d'identifier les forces en présence. Nous reprendrons les tests de traction en faisant évoluer la méthode et en testant les protéines seules. Nous pourrions ainsi définir quelle protéine est à l'origine de ce phénomène d'adhésion où si elles sont plusieurs à y participer. De plus, nous allons réaliser des expériences en utilisant un autre moyen de caractérisation : la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (description : partie A - §5-2). Son principal avantage est que l'on peut déterminer quelle protéine est présente sur les films.

En collaboration avec l'IUT de chimie de Rennes, nous allons aussi analyser les films plastiques en effectuant des mesures d'angles de contact et également des mesures du potentiel zéta. Ces expériences nous permettront de caractériser chimiquement la surface des films (hydrophobie de surface, charge..). Il est clair que dans la littérature, on retrouve facilement les données, l'inconvénient est que l'on connaît mal la formulation des films plastiques.

Enfin, nous ferons des essais avec des polymères tel que le PLA et des polymères fluorés.

A plus long terme, l'idéal serait de mettre au point des méthodes nous permettant d'utiliser des techniques de caractérisation très précise comme l'AFM ou le SFA. Certains protocoles ont déjà été présentés dans la littérature : [3], [6], [28], [29], [75].

Nous allons voir par la suite que certaines des perspectives de stage du mois de juin citées ci-dessus ont pu être atteintes contrairement à d'autres comme par exemple les tests de tractions qui n'ont pu aboutir en raison d'une rupture de stock de matériel technique. Nous allons donc vous décrire les résultats obtenus pendant ces deux mois d'été.

1) Présentation du PLA

Le Poly(Acide Lactique) est un polyester thermoplastique d'origine naturelle dérivé de l'acide lactique. Dans le processus de fabrication (figure 25), on extrait tout d'abord l'amidon à partir généralement de maïs. Le traitement par hydrolyse de l'amidon produit des sucres (glucose, dextrose...) qui sont ensuite traités par fermentation pour convertir ceux-ci en acide lactique. Le processus de polymérisation s'effectue ensuite par polycondensation de l'acide lactique ou plus généralement par ouverture du cycle lactide. Le PLA est devenu la première alternative naturelle du polyéthylène.

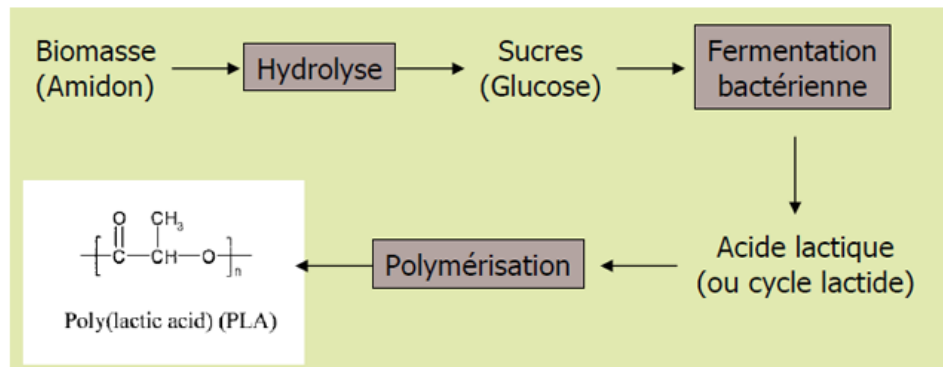


Figure 25 : Cycle de fabrication du PLA

Il est utilisé dans l'alimentation pour l'emballage et plus récemment pour remplacer les sacs et cabas en plastiques jusqu'ici distribués dans les commerces. Il peut être utilisé également en chirurgie où les sutures sont réalisées avec des polymères biodégradables qui sont décomposés par avec l'eau ou/et par des enzymes..

Lors de la soutenance de stage qui a eu lieu à Lorient, nous avons profité du déplacement pour récupérer du PLA au LIMATB, Laboratoire d'Ingénierie des MATériaux de Bretagne. Il utilise un type de PLA qui sert plutôt à la réalisation de composites avec des fibres de lin. Il permettra tout de même de nous donner une idée par rapport à son adhésion aux protéines du blanc d'œuf. Celui que l'on trouve sur le marché des emballages est bien plus épais, conçu pour subir les transformations classiques des plastiques.

2) Infrarouge à transformée de Fourier

Comme nous l'avons décrit précédemment, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'adsorption d'un rayonnement Infrarouge par le matériau analysé, et dans notre cas, les films plastiques. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le polymère (domaine : 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1}). Les informations tirées des spectres sont de deux sortes :

- *Informations qualitatives* : Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Le tableau, montré en annexe n°3

présente les bandes de vibrations caractéristiques des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques. Un même groupe peut donner lieu à plusieurs types de vibrations et donc à des absorptions à différentes fréquences.

- *Informations quantitatives* : L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des films les uns par rapport aux autres.

a. Protocole

Nous avons suivi le protocole rédigé par Marie Hélène Famelart en 2009. Pour lancer une manip, il faut aller dans l'onglet « mesures » et choisir « mesures en mode avancé ». Ensuite, dans l'onglet « standard », le nom de l'échantillon vous sera demandé ainsi que le nom de l'opérateur (indiquer le même nom que le dossier répertoire). La technique à suivre est : MIR ATR. De plus, avant chaque mesure, il faut faire un blanc pour avoir la référence qui est l'air. Enfin, il est recommandé de nettoyer le cristal délicatement après chaque mesure.

Il est important de refroidir, systématiquement avant chaque utilisation de l'appareil, le détecteur avec de l'azote liquide sinon la manip ne pourra être lancée.

- Appareil : Spectromètre IRTF Bruker Tensor 27
- Logiciel : Opus
- Nombre de Scan : 128

b. Résultats

Dans un premier temps, nous avons identifié les polymères en caractérisant les pics obtenus. Nous avons regardé, de la même manière qu'en fluorescence, si la face utilisée a une influence sur l'adhésion et il s'est avéré que oui (constat observé absent en fluo). En effet, les films plastiques testés sont fabriqués avec plusieurs couches de polymères pour répondre à certains critères comme la barrière aux gaz et à l'humidité, la scellabilité...

D'après le rapport rédigé par les deux étudiantes, Tiphaine Boutet et Mélanie Rault, la composition des films est la suivante :

- Surlyn : matériau thermoformable à base de polyamide (= Nylon) et un agent de soudure à base de Surlyn
- Surlyn Supérieur : plastique multicouche coextrudé à barrière EVOH dont la couche de soudure est à base de Surlyn

- LLDPE : matériau thermoformable à base de polyamide non orienté et une couche de soudure constituée de LLDPE
- LDPE : matériau à base polyester, avec une couche barrière d'EVOH et une couche de soudure en LDPE
- PP : plastique multicouche à base de polyamide (= Nylon) et un agent de soudure à base de polypropylène
- PLA : Multicouche de PLA

Nous comprenons bien que le polymère sera différent si l'on s'intéresse à la face A ou à la face B. En effet, si nous observons la figure 26 ci-dessous qui représente les spectres des films plastiques avec leur deux faces superposées, nous pouvons dire qu'il y a des différences. C'est pourquoi, nous allons identifier chacune des faces.

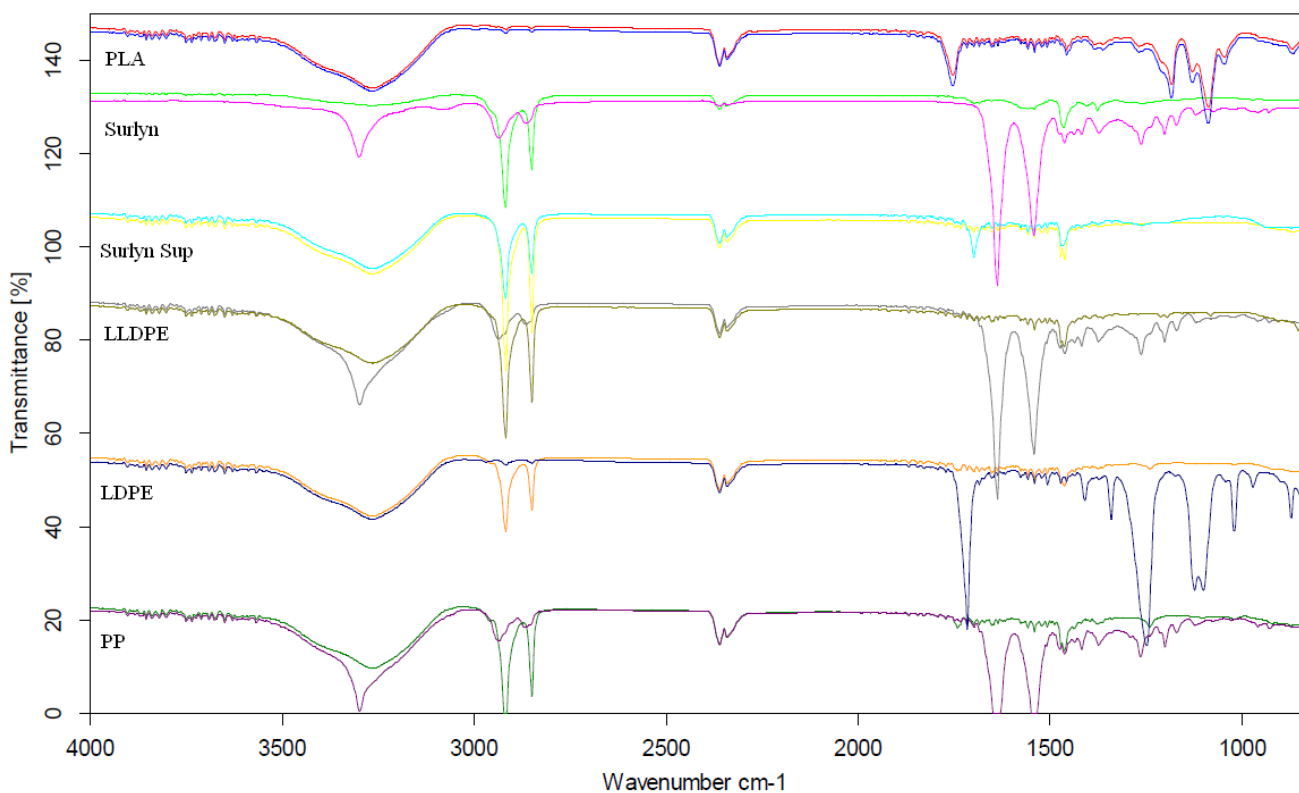


Figure 26 : Spectres IR correspondant aux six plastiques (face A et face B)

Pour chaque spectre, il apparaît deux pics aux alentours de 2360 cm^{-1} . Ils ne sont pas à prendre en compte car ils représentent le CO_2 atmosphérique (le blanc effectué avant chaque manipulation n'a pas permis de l'éviter). De plus, une bande large et intense apparaît sur tous les spectres à 3260 cm^{-1} . Elle représente la fonction alcool de la sous-couche d'EVOH présente à l'intérieur des films polymères. De la même façon, nous n'en tiendrons pas viguer.

Pour les faces B du Surlyn, du LLDPE et du PP, respectivement en rose, gris et violet, on reconnaît les pics caractéristiques de la fonction amide présente dans la couche supérieure (polyamide) des films polymères :

- 3400 - 3300 cm^{-1} : Elongation N-H
- 1680 - 1630 cm^{-1} : C=O
- 1650 - 1550 cm^{-1} : Déformation N-H
- 1180 - 1040 cm^{-1} : Elongation C-N

Nous comprenons ici que ces faces ne représentent pas les plastiques étudiés mais bien le Nylon. Après avoir identifier toutes les faces, nous avons présenté sur un même graphe les spectres IR caractéristiques des films plastiques étudiés jusqu'à présent.

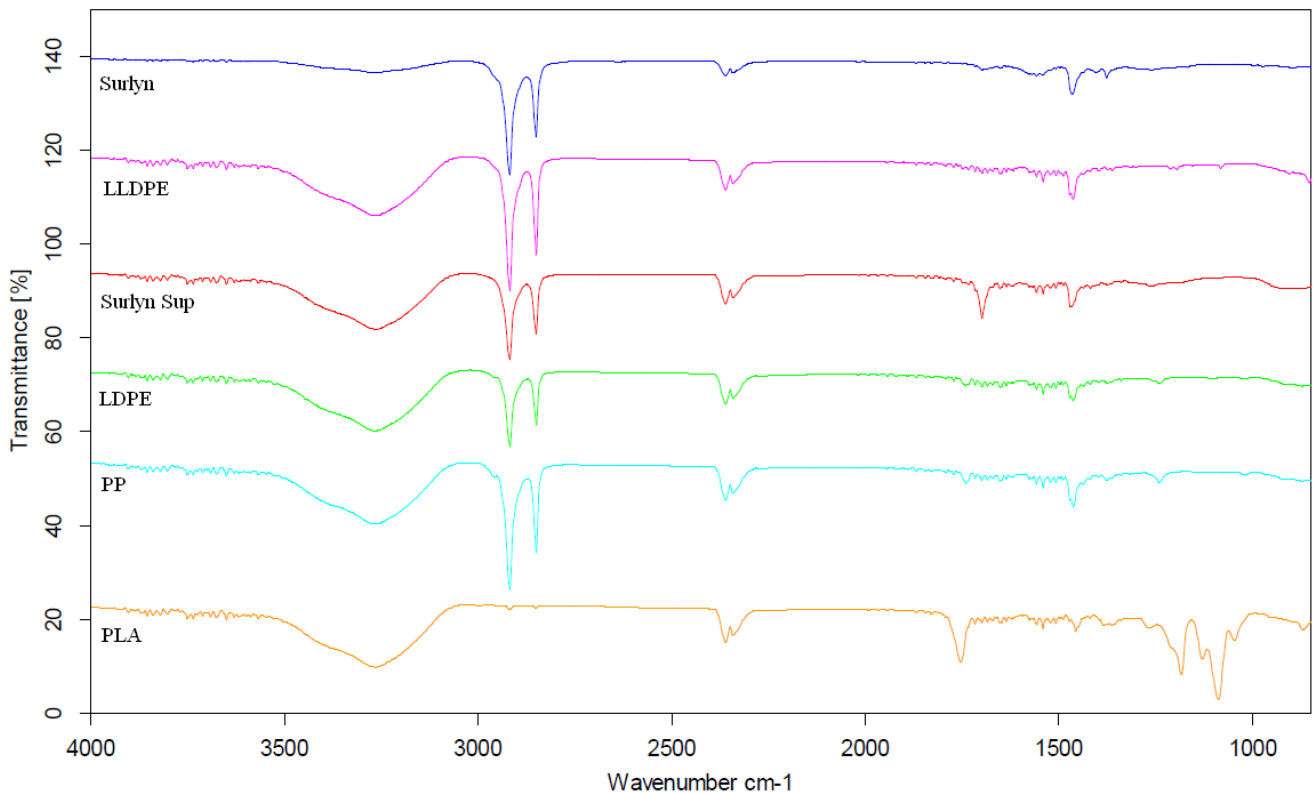


Figure 27 : Spectres IR correspondant à la face A de chaque film plastique

Les spectres des faces A du PP, LDPE et LLDPE sont très proches du fait de leur structure chimique (figure 27). En effet, ils appartiennent à la même famille de polymère : les polyoléfines (cf p.33). Si nous souhaitons les différencier, il est nécessaire de faire d'autres analyses comme la RMN du proton. Dans notre cas, nous n'en avons pas besoin car nous connaissons déjà la nature des films. Les pics caractéristiques de cette famille sont les suivants :

- 2950 et 2850 cm^{-1} : élongation des CH_2 , CH_3 présents dans la chaîne carbonée
- 1460 cm^{-1} : déformation des CH_2 et CH_3

Les spectres correspondant au surlyn et au surlyn Sup sont semblables malgré qu'un pic soit plus prononcé pour le surlyn sup à 1700 cm^{-1} , caractéristique de la liaison C=O. Il est important de rappeler que le surlyn est un ionomère et qu'il contient un faible pourcentage de groupement carboxyle. C'est la raison pour laquelle ce groupe est difficilement détectable.

Le PLA, quant à lui, a les pics correspondant à la fonction ester :

→ 1750 cm^{-1} : C=O

→ 1150 et 1050 cm^{-1} : élongation du C-O

Dans cette première partie, nous avons mis en évidence que la face du film a une importance. Il faut être très vigilant pendant chaque manipulation pour étudier le bon côté. La face peut avoir une forte influence sur l'adhésion des protéines. En effet, si nous travaillons sur la face correspondante aux polyamides (même structure chimique que les protéines), l'adhésion sera favorisée et beaucoup plus forte.

Rq : Tous les essais réalisés jusqu'à présents ont été fait sur la bonne face. La face A des films correspond à la face où le nom du polymère est écrit dessus.

Dans un second temps et de la même manière que le protocole utilisé en fluo, nous sommes venus fixer les protéines du blanc d'œuf sur les films plastiques par chauffage. En effet, une fois les faces identifiées, nous avons déposé du blanc d'œuf directement sur la surface des films puis mis l'ensemble à l'étuve pendant 1h à 93°C avant de les passer en IR. L'objectif est dans un premier temps d'étudier la présence ou non de protéines après la cuisson et le rinçage mais aussi d'en déduire le polymère qui adhèrera le moins. Par analyse quantitative, l'idéal serait de déterminer quelle est la protéine présente en plus grande quantité (beaucoup moins évident).

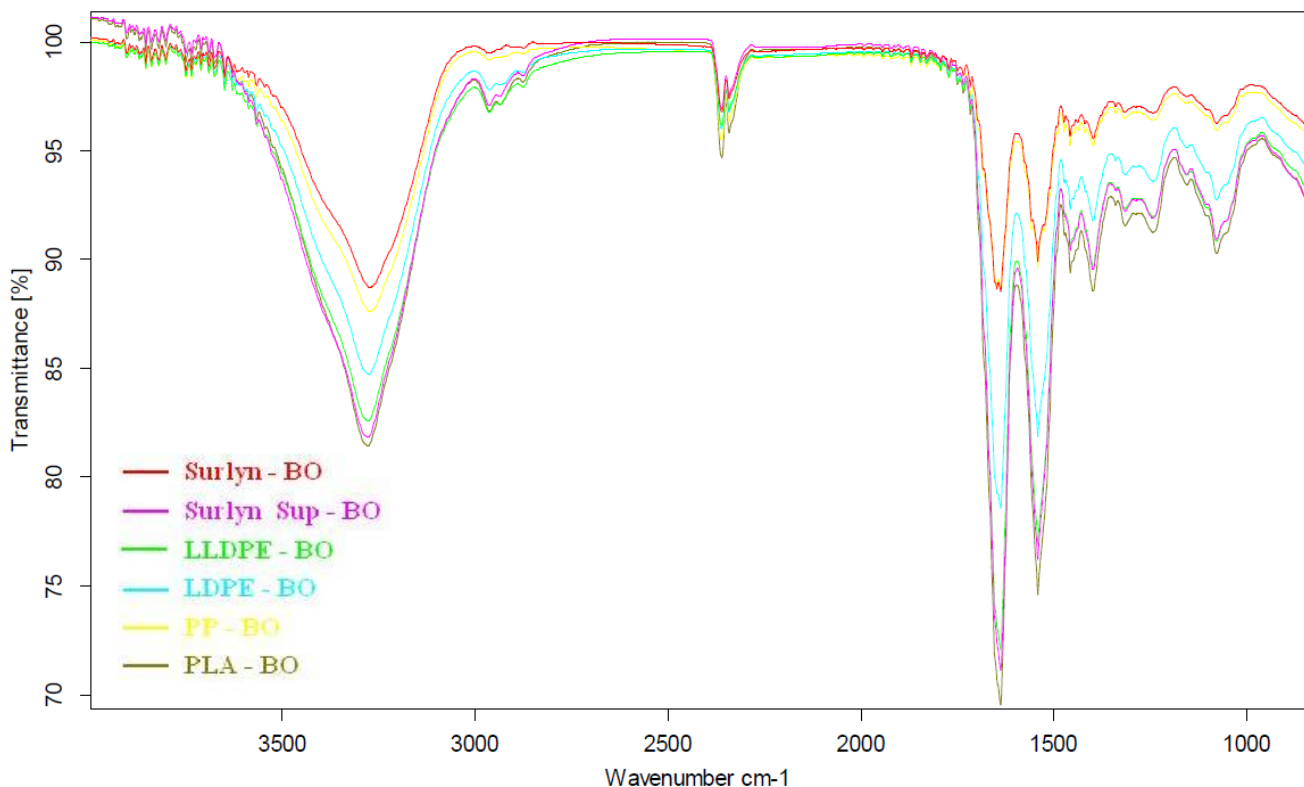


Figure 28 : Spectres représentant les films avec le blanc d'œuf cuit à la surface

Si nous considérons la figure 28, pour tous les films plastiques et sans exception, nous obtenons les pics caractéristiques de la fonction « amide » présente dans toutes les protéines du blanc d'œuf. Il y a donc adhésion dans chaque cas. De plus, l'intensité des pics dépend de la quantité de blanc d'œuf déposé préalablement, nous ne pouvons pas préciser quelle protéine est présente ou non.

Après rinçage, les spectres obtenus (pas montrés ici) correspondent de nouveau à ceux des polymères avec notamment les deux pics à 2950 et 2850 cm^{-1} caractéristiques de l'élongation des alcanes CH_x présents sur toutes les chaînes carbonées des polymères. Dans ce cas, un simple rinçage a permis d'éliminer les protéines présentes à la surface des films.

3) Mesure d'angles de contact

a. Principe

→ Angles de contact :

La mesure de l'angle de contact est la méthode la plus utilisée pour caractériser la mouillabilité d'un solide par un solvant. Elle nécessite des conditions particulières : réaliser les mesures sur une surface plane et sèche ainsi que l'utilisation de solvants ultra purs. En 1805, Young a proposé une théorie du mouillage : la forme de la goutte dépend de la balance des forces entre la tension interfaciale solide-liquide γ_{sl} , la tension de surface solide-gaz γ_s et la tension de surface liquide-gaz γ_l . θ représente l'angle formé entre le liquide et le solide (figure 29).

A l'équilibre l'équation de Young s'exprime par : $\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cos \theta$ (équation 1)

L'énergie de surface entre le liquide et le solide est donnée par l'équation de Dupré :

$$\Delta G_{sl} = \gamma_{sl} - \gamma_s - \gamma_l \quad (\text{équation 2})$$

En mettant en commun les équations 1 et 2, nous obtenons l'équation de Young-Dupré :

$$\Delta G_{sl} = -\gamma_l (1 + \cos \theta) \quad (\text{équation 3})$$

Quelle que soit la valeur de θ , ΔG_{sl} est toujours négatif. Si θ est grand, il y aura une faible affinité entre le liquide et le solide et inversement si θ est petit, il y aura une grande affinité entre le liquide et le solide.

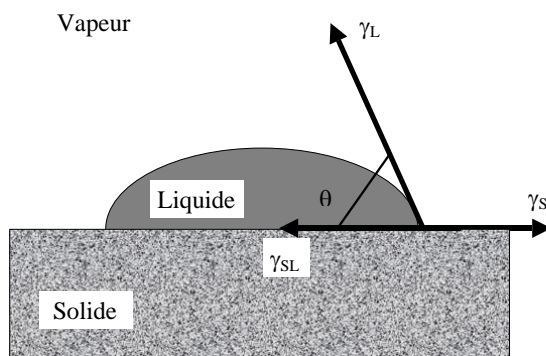


Figure 29 : Schéma de mesure de l'angle de contact par la technique de la goutte posée

→ Forces d'interactions

Les interactions entre le liquide et le solide sont des interactions non covalentes. Elles se décomposent en deux forces.

- Les forces dispersives (γ^d) ou de Van der Waals (γ^{LW}). Elles sont décrites par Chaudhury (1984) comme la somme des contributions des tensions superficielles dues à trois forces : les forces de dispersion (London), les forces de polarisation (Keesom) et les forces de polarisabilité (Debye).

$$\gamma^{LW} = \gamma^L + \gamma^K + \gamma^D \quad (\text{équation 4})$$

Good a défini les interactions apolaires entre deux composés 1 et 2 par :

$$\gamma_{12}^{LW} = ((\gamma_1^{LW})^{1/2} - (\gamma_2^{LW})^{1/2})^2 \quad (\text{équation 5})$$

- Les forces non dispersives (γ^p) ou polaires (γ^{AB}) pour lesquelles deux théories s'opposent. Fowkes et Van Oss ont défini :

$$\Delta G = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} \quad (\text{équation 6})$$

Des équations 2 et 5, il est obtenu : $\Delta G_{12}^{LW} = -2(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})^{1/2}$ (équation 7)

→ Théorie de Van Oss

La composante polaire (γ^{AB}) ou acide-base (AB) de Lewis se décompose en :

- Une composante accepteurs d'électrons γ^+ (acide de Lewis, A)
- Une composante donneuses d'électrons γ^- (base de Lewis, B).

$$\gamma_i^{AB} = 2(\gamma^+ \gamma^-)^{1/2} \quad (\text{équation 8})$$

Le solvant polaire de référence est l'eau où $\gamma^+ = \gamma^- = 25,5 \text{ mJ/m}^2$.

$$\gamma_{12}^{AB} = 2((\gamma_1^+)^{1/2} - (\gamma_2^-)^{1/2})((\gamma_1^-)^{1/2} - (\gamma_2^+)^{1/2}) \quad (\text{équation 9})$$

Ceci permet d'obtenir d'après l'équation 2 : $\Delta G_{12}^{AB} = -2((\gamma_1^+ \gamma_2^-)^{1/2} + (\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2})$ (équation 10)

Les équations 9 et 10 combinées à l'équation 6 donnent :

$$\boxed{\gamma_1 (1 + \cos \theta) = 2((\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})^{1/2} + (\gamma_1^+ \gamma_2^-)^{1/2} + (\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2})} \quad (\text{équation 11})$$

Il est possible de déterminer les différentes composantes d'un solide à partir de mesures d'angle de contact avec 3 solvants différents pour lesquelles les constantes γ^{LW} , γ^+ et γ^- sont connues. Van Oss préconise l'utilisation d'un solvant apolaire, $\gamma^+ = \gamma^- = 0$, permettant d'obtenir directement par cette mesure la valeur de γ_s^{LW} à partir de l'équation 11 réduite à :

$$\gamma_1 (1 + \cos \theta) = 2((\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})^{1/2}) \quad (\text{équation 12})$$

Il reste alors à déterminer deux équations à deux inconnues pour deux solvants polaires.

La méthode de calcul de Van Oss permet d'obtenir les valeurs de $(\gamma_s^+)^{1/2}$ et $(\gamma_s^-)^{1/2}$. Dans de nombreux cas, γ_s^+ et γ_s^- sont très faibles par rapport à γ_s^{LW} , la valeur de $(\gamma_s^+)^{1/2}$ est inférieure à 0, ce qui est impossible. Van Oss a longtemps considéré que si cette valeur était négative, il fallait la considérer comme nulle. Dans ce cas, la valeur de $(\gamma_s^-)^{1/2}$ est recalculée avec $\gamma_s^+ = 0$ et la valeur admise pour γ_s^- est la moyenne des valeurs obtenues avec les différentes paires (un solvant apolaire et un solvant polaire) de solvants utilisés.

→ Les composants pour les principaux polymères

Avec la série habituelle des liquides d'angle de contact (c'est-à-dire le diodométhane, l'eau, le glycérol ou encore le formamide...), Van Oss a mesuré les angles de contact sur une variété de surfaces de polymères (figure 30). On peut voir que la plupart des polymères ont une valeur de $\gamma^{LW} = 40\text{mJ/m}^2 \pm 10\%$. De plus, la plupart de ces polymères sont principalement des donneurs d'électrons. Suite aux différentes expériences réalisées, nous devrions retrouver ces valeurs :

Polymère	γ	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^D	γ^P
Teflon FEP	17,9	17,9 ^{a)}	0	0	0
Polyisobutylène	25,0	25,0 ^{b)}	0	0	0
Polypropylène	25,7	25,7 ^{b)}	0	0	0
Polypropylène traité par corona	33,0	33,0 ^{c)}	0	0 ^{d)}	11,1 ^{e)}
Polyéthylène	33,0	33,0 ^{d)}	0	0	0
Nylon 6-6	37,7	36,4 ^{e)}	1,3	0,02 ^{e)}	21,6 ^{e)}
Polyméthyl-méthacrylate (PMMA)	40,0	40,0 ^{e)}	0	0 ^{e)}	14,6 ^{e)}
PMMA	40,6	40,6 ^{b)}	0	0 ^{b)}	12 ^{b)}
PMMA	41,4	41,4 ^{d)}	0	0 ^{d)}	12,2 ^{d)}
Polystyrène	42	42 ^{f)}	0	0	1,1 ^{f)}
Polystyrène modifié pour culture de cellules ^{g)}	46,8	43,7	3,1	0,12	20,0
Polyvinylalcool	42	42 ^{e)}	0	0 ^{e)}	17-57 ^{a,b)}
Polyvinylpyrrolidone	43,4	43,4 ^{f)}	0	0 ^{f)}	29,7 ^{f)}
Chlorure de polyvinyle	43,8	43,0 ^{h)}	0,75	0,04 ^{h)}	3,5 ^{h)}
Polyoxyéthylène (POE - 6 000)	43,0	43,0 ^{e)}	0	0 ^{e)}	64 ^{e)}
Polyoxyéthylène (POE - 6 000)	45,9	45,9 ^{e)}	0	0 ^{e)}	58,5 ^{e)}
Polyoxytétraméthylène glycol ⁱ⁾ (pds mol. \approx 2 000)	44,0	41,4 ^{b)}	2,6	0,06 ^{d)}	27,6 ^{d)}
Co-poly(éthylène glycol, propylène glycol) ⁱ⁾ (pds mol \approx 2 000)	47,5	42,0 ^{m)}	5,5	0,13 ⁿ⁾	58,8 ⁿ⁾
Co-poly(oxyéthylène, oxypropylène) ⁱ⁾ (pds mol \approx 1 000)	47,9	40,9 ^{e)}	7,0	0,22 ^{o)}	55,6 ^{o)}

Figure 30 : Composants et paramètres de tension superficielle de différents polymères synthétiques, (à 20°C, en mJ/m²)

b. Protocole

Dans un premier temps, nous avons analysé les films plastiques avec de l'eau et du blanc d'œuf. Les résultats obtenus sont discutables en raison des écarts types importants. C'est pourquoi lors des expériences suivantes, nous avons préalablement placé les films plastiques 24h avant à l'étuve afin de permettre un séchage optimal de la surface. L'usage des gants est nécessaire afin d'éviter tout contact avec la surface.

De plus, nous avons utilisé trois solvants avec des propriétés différentes :

- Eau : solvant très polaire
- Diiodométhane : solvant polaire
- Formamide : solvant apolaire

La formation de la goutte est faite manuellement, environ 5 graduations. Puis, la dépose sur le film ainsi que la mesure de l'angle sont fait automatiquement (figure 31). La photo est prise après 100 ms, temps pour laquelle la goutte est à l'équilibre.

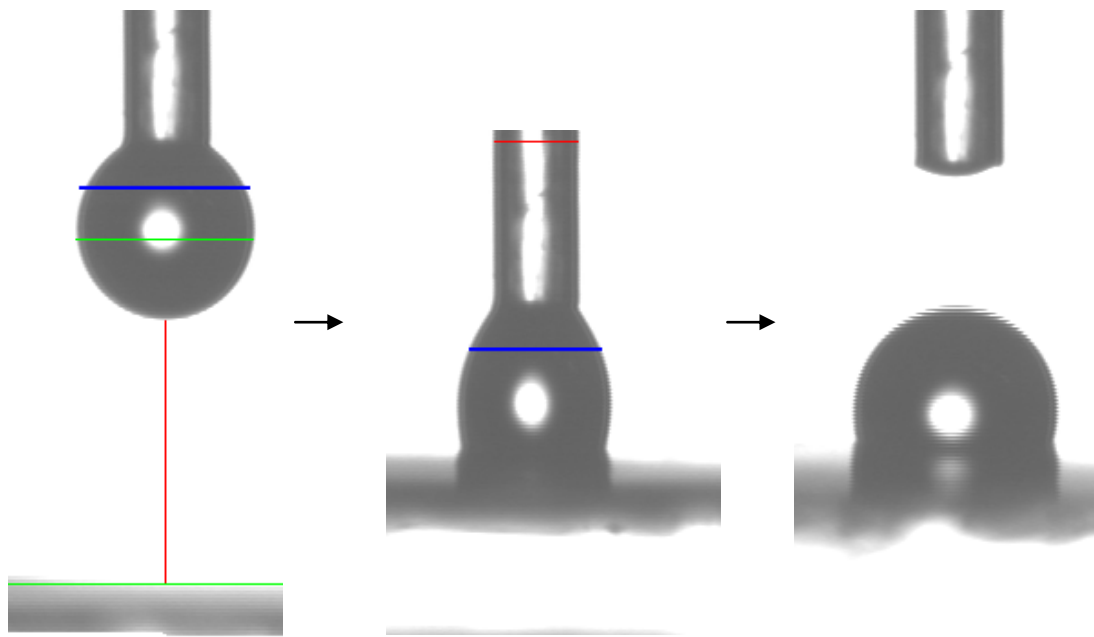


Figure 31 : Schéma de la dépose de la goutte

c. Résultats

L'avantage de cette méthode est que l'on peut déterminer le degré d'hydrophobie du polymère ainsi que les composantes Donneurs / Accepteurs d'électrons. La surface est alors mieux définie. Le tableau n°2 compare les angles obtenus avec de l'eau et du blanc d'œuf à la surface des films plastiques :

Solvant : Eau

	Surlyn	Surlyn Sup	PP	LDPE / D	LLDPE	PLA
θ	94,96	90,63	82,65	95,61	86,31	80,14
+/-	4,03	4,51	3,72	3,58	2,89	6,95

Solvant : Blanc d'œuf

	Surlyn	Surlyn Sup	PP	LDPE / D	LLDPE	PLA
θ	91,21	96,07	85,07	91,92	91,39	79,44
+/-	3,90	4,21	4,58	4,82	2,85	4,78

Tableau n°2 : Angles de contact obtenus avec de l'eau et du blanc d'œuf

D'après David Delaunay, Post Doc à l'IUT de chimie de Rennes, pour des valeurs d'angle aussi élevées, un écart type de +/- 5 est accepté. Les résultats obtenus sont répétables mais il faut toujours faire attention à l'état de surface. C'est pourquoi, nous avons pensé qu'un passage à l'étuve avant chaque expérience de tension de surface serait à envisager. D'autres paramètres comme l'humidité de la pièce sont également à prendre en compte. En effet, si la pièce est humide, la surface des films plastiques peut être modifiée.

Rq : Pour une série de données, par exemple pour le PLA, la grande variation de mesures est due à la géométrie des gouttes qui ne sont pas toujours rondes (problèmes de surface).

Plus l'angle est grand et moins il y a d'affinités entre le solvant et le film. Si nous considérons les résultats obtenus, le Surlyn et le LDPE sont les polymères les plus hydrophobes. Le PP et le PLA présente tous deux un caractère plus hydrophile mais les valeurs d'angles restent très élevés. Si le solvant est du blanc d'œuf, c'est le Surlyn Sup qui serait le film présentant le moins d'affinité avec les protéines du blanc d'œuf. A l'opposé, le PLA et le PP sont les deux films présentant le plus d'affinité avec le blanc d'œuf. Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus en traction et en fluo, ils ne sont pas en accord. C'est pourquoi, nous avons réalisé une autre série en plaçant tous les films à l'étuve dans le but d'optimiser les valeurs d'angles de contact. De plus, des solvants différents ont été utilisés.

Le tableau n°3 présente les valeurs obtenues en fonction de trois solvants aux propriétés différentes. L'angle de contact représenté pour chaque film correspond à une moyenne réalisée avec 20 gouttes

Solvant : Eau

	Surlyn	Surlyn Sup	PP	LDPE	LLDPE	PLA
θ	98,63	102,97	98,63	104,48	104,30	98,73
+/-	4,20	4,25	4,20	3,18	3,38	4,18

Solvant : Formamide

	Surlyn	Surlyn Sup	PP	LDPE	LLDPE	PLA
θ	78,20	90,16	85,29	83,92	93,26	82,93
+/-	3,26	3,10	3,89	2,94	3,52	3,88

Solvant : Diiodométhane

	Surlyn	Surlyn Sup	PP	LDPE	LLDPE	PLA
θ	55,20	56,21	58,90	66,27	61,09	66,36
+/-	4,22	5,15	3,34	2,60	3,33	2,19

Tableau n°3 : Angles obtenus avec trois solvants différents (en degré)

Les valeurs obtenues avec l'eau sont plus élevées que dans la première expérience. Ce sont le LDPE et le LLDPE qui présentent le caractère le plus hydrophobe.

→ **Calcul des composantes :**

Grâce à un logiciel « Excel » (réalisé par David Delaunay) et grâce aux composantes connues des solvants présentés ci-dessous (tableau n°4) nous pouvons obtenir directement les composantes polaires, donneurs ou accepteurs d'électrons des films polymères.

	Eau	diiodométhane	Formamide
Gamma LW	4,67	7,13	6,24
Gamma +	5,05	0,00	1,51
Gamma -	5,05	0,00	6,29
Gamma L	72,80	50,80	58,00

Tableau n°4 : Composantes des solvants utilisés

Si nos calculs sont exacts, nous devrions retrouver les valeurs théoriques présentées à la figure 30 :

	γ^{LW}	γ^+	γ^-
Surlyn	31,32	0	1,59
Surlyn Sup	30,74	1,78	3,27
PP	29,21	0,72	3,94
LDPE	24,99	0	0,73
LLDPE	27,95	1,83	3,6
PLA	24,94	0	2,84

Tableau n°5 : Composantes expérimentales (mJ/m²)

Pour l'ensemble des films testés, les résultats obtenus sont plus faibles que les résultats théoriques. Pour la composante polaire théorique d'un polyéthylène, Van Oss obtient une valeur de 33 mJ/m² alors que nous obtenons respectivement 25 et 28 mJ/m² pour le LDPE et le LLDPE... De plus, la composante « accepteur d'électrons », γ^+ , des films Surlyn sup, PP et LLDPE, est fautive. En effet, on obtient le carré d'une racine négative, ce qui est impossible.

Nous avons refait tous les calculs selon la théorie de Van Oss et systématiquement, les valeurs mesurées conduisent à une erreur de calcul. La composante γ^+ est fautive ce qui implique que les autres le sont aussi. Le plus probable est que le séchage n'a pas été assez efficace, il reste des traces d'eau sur les films qui forme une interface entre le film mesuré et les solvants diiodométhane et formamide, faussant ainsi les mesures. Ce problème de séchage a déjà été rencontré sur des matériaux polymère et notamment des membranes.

Il est plus prudent de ne comparer que les angles et non les calculs.

Cette méthode de caractérisation des surfaces est très intéressante et les conditions expérimentales se doivent d'être améliorées. Si nous rappelons la théorie d'Inoue *et al*, ils ont proposé les caractéristiques idéales pour empêcher le phénomène d'adhésion : le matériau doit être hydrophile, doit contenir des liaisons H accepteurs et doit être électriquement neutre [21]. L'une des conditions importantes est que le polymère ne doit pas contenir de liaisons H donneur, sinon il y aura adhésion.

4) Les responsables R&D sensibilisés

Après la rencontre avec les industriels le 1^{er} Juillet dernier, nous avons longuement discuté de ce qui était à envisager pour contourner ce problème d'adhésion. Nous avons supposé qu'un traitement de surface (plasma par exemple) était la solution technique la plus plausible. L'utilisation de polymère fluoré peut s'avérer être une solution également.

Nous avons donc contacté plusieurs entreprises, via Internet, comme ARKEMA ou encore NMA, en leur demandant s'il serait possible de recevoir des échantillons de polymères fluorés. Nous avons également contacté des sociétés spécialisées dans les traitements de surfaces et notamment les traitements Plasma (Plasmatreat, IntCo...) en leur demandant s'il était possible de recevoir des échantillons de films traités. Nous sommes également entrés en contact avec les responsables R&D de Parckartis (fournisseur de PEP).

Suite à des réunions internes entre les responsables R&D de Parckartis, PEP et de la CECAB, ils ont discuté ensemble de ce problème d'adhésion et ont mis au point des méthodes de traitement des films plastiques.

- Conclusion -

L'étude des phénomènes d'adsorption sur surfaces solides est donc un domaine très compliqué. Sa pertinence scientifique se manifeste de plusieurs manières dans différents domaines et notamment dans des applications biotechnologiques telles que la conception de matériaux biocompatibles comme des implants, des médicaments cibles ... Depuis les années 1970, les scientifiques sont conscients de la complexité de ce phénomène d'adsorption et bien que les recherches aient considérablement progressées, la compréhension n'est toujours pas claire et le comportement des protéines au contact d'interface solide reste flou.

La multitude de facteurs influençant l'adsorption des protéines n'arrangent pas cette ***. En effet, des détails comme la composition des solutions (pH, force ionique), la température, la protéine elle-même, les techniques de mesure rendent la thématique de l'adsorption très compliquée. Des efforts constants sont sans cesse entrepris afin d'accroître la précision, la fiabilité des travaux expérimentaux et une approche étape par étape est nécessaire pour comprendre le phénomène d'adsorption. On peut supposer qu'il y aura bientôt des solutions qui combineront les avantages de différentes techniques (résolution spatiale élevée, haute sensibilité...). Des modèles mathématiques basés sur des données expérimentales permettent aujourd'hui de tester et d'affirmer certaines hypothèses[48]. Ces approches de calculs sont prometteuses car elles sont indépendantes des contraintes expérimentales.

Les résultats présentés sont encourageants car nous avons testé deux techniques différentes et les films plastiques testés ont réagi de la même manière. Pour conclure, nous pouvons dire que le PEBD et le PP ont des propriétés moins adhésives avec les protéines du blanc d'œuf contrairement au LLDPE et au Surlyn qui ont des propriétés beaucoup plus adhésives avec les protéines.

En mettant en commun tous les résultats obtenus (bibliographique et expérimentales), les liaisons que nous pensons avoir identifiées sont les suivantes : principalement des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. Les liaisons ioniques apparaissent seulement avec le surlyn. C'est pourquoi ce type de polymère, contenant des groupements carboxyles, est à éviter si l'on souhaite utiliser la technique de cuisson dans l'emballage.

De plus, notre rencontre avec les responsables R&D de l'entreprise a été bénéfique. Nous avons discuté sur les réponses à apporter à la problématique du stage afin d'en déduire des solutions à adopter pour réduire (ou éviter) l'adhésion.

Mais pour bien comprendre ce qui se passe à l'interface, il faudrait observer à l'échelle nanométrique en se focalisant des techniques lourdes comme l'AFM...

- Références -

- [1] C.B. Clardy, I.Y. Han, J.C. Anton, F. Wardlaw, W. Brigdes and P. Dawson; “*Protein-to-film adhesion as examined by amino analysis of protein binding to three different packaging film*”, Poultry Sciences 77 (1998) 745-751
- [2] Theodora S. Tsapikouni, Yannis F. Missirlis, “*Protein-material interaction: from micro-to-nano scale*”, Materials Sciences and Engineering B 152 (2008) 2-7
- [3] Brian P. Frank, G. Belfort, “*Atomic force microscopy for low-adhesion surfaces: thermodynamic criteria, critical surface tension and intermolecular forces* », Langmuir 17 (2001) 1905-1912
- [4] F. Pincet, E. Perez, G. Belfort, “*Molecular interactions between proteins and synthetic membrane polymer film*”, Langmuir 11 (1995) 1229-1235
- [5] C. Constantinescu, A. Palla-Papavlu, A. Rotaru, P. Florian, “*Multifunctional thin films of lactoferrin for biochemical use deposited by MAPLE technique*”, Applied Surface Science 255 (2009) 5491-5495
- [6] Li-Chong Xu, C.A. Siedlecki, “*AFM studies of the initial Interactions between fibrinogen and surfaces*”, Langmuir 25 (2009) 3675-3681
- [7] A. Sethuraman, M. Han, Ravi S. Kane, G. Belfort, “*Effect of surface wettability on the adhesion of protein*” Langmuir 20 (2004) 7779-7788
- [8] S. Pillai, A. Arpanaei, Rikke L. Meyer, V. Birkedal, “*Preventing Protein adsorption from a range of surface using an aqueous fish protein extract*”, Biomacromolecules 10 (2009) 2759-2766
- [9] J.P. Piette, L. Ligneau, C. Leblanc, M. Marcotte, L. Deschênes, “*Influence of processing on adherence of highly extended ham to its cooking bag*”, Meat Science 48 (1998) 101-113
- [10] M.J. Rosinski, C.R. Barmore, R.L. Dick, J.C. Anton, “*Film Sealant and vacuum effects on two measures of adhesion at the sealant-meat interface in cook-in packaging system for processed meat*”, Journal of food science 54 (1989) 863-866
- [11] C.B. Clardy, P.L. Dawson, “*Film type effects on meat-to-film adhesion examined by Scanning Electron Microscopy*”, Poultry science 74 (1995) 1053-1057
- [12] J.M. Goddard, J.N. Talbert, J.H. Hotchkiss, “*Covalent attachment of Lactase to Low-Density polyethylene films*”, Journal of food science 72 (2007) 36-41
- [13] C.A. Kendrick, J.C. Acton, “*Salt concentration, type of phosphate and film sealant effect on meat adhesion to packaging film*”, Journal of Muscle Foods 12 (2001) 171-184
- [14] S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, “*Measurement of the interaction forces between proteins and Iniferter-Based Graft-Polymerized surfaces with an Atomic Force Microscope in aqueous media*”, Langmuir 17 (2001) 1080-1087
- [15] V. Receveur, D. Durand, M. Desmadril, P. Calmettes, “*Repulsive interparticle interactions in a denatured protein solution revealed by small angle neutron scanning*”, FEBS letters 426 (1998) 57-61
- [16] A.J. Petrescu, B. Roux, V. Receveur, D. Durand, M. Desmadril, P. Calmettes “*Small-angle neutron scattering by a strongly denatured protein: analysis using random polymer theory*”, Biophysical Journal 72 (1997) 335-342

- [17] S. Chen, C. Zhao, J. Zheng, “*Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials*”, *Polymer* 51 (2010) 5283-5293.
- [18] M. O’Neill, N.D. McMillan, G. Dunne “*New tensiographic studies on protein cleaning of polymer surfaces*”, *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* 323 (2008) 109-115
- [19] Hans Elwing, “*Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research*”, *Biomaterials* 19 (1998) 397-406
- [20] S. Gon, M.M. Santore, “*Single Component and Selective Competitive Protein Adsorption in a Patchy Polymer Brush: Opposition between Steric Repulsions and Electrostatic Attractions*” *Langmuir* 27(4) (2011) 1487-1493
- [21] Y. Inoue, T. Nakanishi, K. Ishihara, “*Adhesion force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces*”, *Reactive & Functional Polymers* 71 (2011) 350-355
- [22] H. Xu, J.L. Kaar, A.J. Russell, “*Characterizing the modification of surface proteins with poly(ethylene glycol) to interrupt platelet adhesion*”, *Biomaterials* 27 (2006) 3125-3135.
- [23] A. Malzert-Fréon, O. Abillon, J.E. Proust, R. Gref, “*Interactions between hen egg-white lysozyme, PEG2,000, and PLA50 at the air–water interface*” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42 (2005) 97-106
- [24] E.L. Furness, A. Ross, T.P. Davis, “*A hydrophobic interaction site for lysozyme binding to polyethylene glycol and model contact lens polymers*” *Biomaterials* 19 (1998) 1361-1369
- [25] A.Rita Bizzarri, S. Cannistraro, “*Atomic Force Spectroscopy in Biological Complex Formation: Strategies and Perspectives*” *The journal of chemical chemistry B* vol. 113, no. 52 (2009)
- [26] J. Klein, “*Long-ranged surface forces: The structure and dynamics of polymers at interfaces*”, *Pure & Appl. Chem.*, 64 (1992) 1577-1 584
- [27] M. Gaczynska, P.A. Osmulski, “*AFM of biological complexes: What can we learn?*”, *Current opinion in Colloid & Interface science* 13 (2008) 351-367
- [28] J. Gu, Z. Xiao, C-M Yam, G. Qin, M. Deluge, S. Boutet, C. Cai “*Attaching single biomolecules selectively to the Apex of AFM tips for measuring specific interactions*” *Biophysical journal: biophysical Letters* (2005)
- [29] G. Olanya, E. Thormann, I. Varga, R. Makuška, P.M. Claesson, “*Protein interactions with bottle-brush polymer layers: Effect of side chain and charge density ratio probed by QCM-D and AFM*”, *Journal of Colloid and Interface Science* 349 (2010) 265-274
- [30] J. Wei, L. Yan, X. Hu, X. Chen, Y. Huang, X. Jing, “*Non-specific and specific interactions on functionalized polymer surface studied by FT-SPR*”, *Colloids and surface B: Biointerfaces* 83 (2011) 220-228
- [31] Y. Yan, G. Marriott, “*Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*”, *Current Opinion in Chemical Biology* 7 (2003) 635–640
- [32] M.P. Brown, C. Royer, “*Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions*”, *Current Opinion in Biotechnology* 8 (1997) 45-49
- [33] L. Zhang, B. Wu, Z. Su, X. Chen, “*Quantification of the complexation of protein with neutral water borne polymer by fluorescence spectroscopy*”, *Polymer* 49 (2008) 5622–5625
- [34] A. Mozo-Villarias, “*Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins*”, *J. Biochem. Biophys. Methods* 50 (2002) 163–178

- [35] B. Lassen, M. Malmsten, “*Competitive Protein Adsorption Studied with TIRF and Ellipsometry*”, Journal of colloid and interface science 179 (1996) 470-477
- [36] S. Kodera, T. Okajima, H. Iwabuki, D. Kitaguchi, S. Kuroda, T. Yoshinobu, K. Tanizawa, M. Futai, H. Iwasaki, “*Detection of protein–protein interactions on SiO₂/Si surfaces by spectroscopic ellipsometry*” Analytical Biochemistry 321 (2003) 65-70
- [37] C. Werner, K.-J. Eichhorn, K. Grundke, F. Simon, W. Grählert, H.-J. Jacobasch, “*Insights on structural variations of protein adsorption layers on hydrophobic fluorohydrocarbon polymers gained by spectroscopic ellipsometry (part I)*”, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 156 (1999) 3–17
- [38] A. Malzert, F. Boury, D. Renard, P. Robert, L. Lavenant, J.P. Benoît, J.E. Proust, “*Spectroscopic studies on poly(ethylene glycol)–lysozyme interactions*” International Journal of Pharmaceutics 260 (2003) 175–186
- [39] S. Magazu, F. Migliardo, D. Barreca, E. Bellocco, G. Lagana, “*Neutron scattering study on the interaction between polyethylene glycol and lysozyme*”, Physica B 403 (2008) 2408–2412
- [40] J. Ladd, Z. Zhang, S. Chen, J.C. Hower, S. Jiang, “*Zwitterionic Polymers Exhibiting High Resistance to Nonspecific Protein Adsorption from Human Serum and Plasma*”, Biomacromolecules 9 (2008) 1357-1361
- [41] E.R. McCarney, J.H. Werner, S.L. Bernstein, I. Ruczinski, D.E. Makarov, P.M. Goodwin, K.W. Plaxco, “*Site-specific Dimensions Across a Highly Denatured Protein; A Single Molecule Study*” J. Mol. Biol. 352 (2005) 672-682
- [42] Ouvrage “*Science et technologie de l’œuf. Volume 2 : de l’œuf aux ovoproduits*”, Editions TEC & DOC, Lavoisier (2010) - 562 pages
- [43] R.A. Silva, M.D. Urzua, D.F.S. Petri, “*Lysozyme binding to poly(4-vinyl-N-alkylpyridinium bromide)*” Journal of Colloid and Interface Science 330 (2009) 310-316
- [44] I. Van de Keere, R. Willaert, A. Hubin, J. Vereecken, “*Interaction of human plasma fibrinogen with commercially pure titanium as studied with Atomic Force Microscopy and X-ray photoelectron microscopy*”, Langmuir 24 (2008) 1844-1852
- [45] A.R. Bizzarri, S. Cannistraro, “*Atomic Force Spectroscopy in biological complex formation: strategies and perspectives*”, The journal of physical chemistry B 113 (2009) 16449-16464
- [46] T. Boutet, M. Rault “*Identification des liaisons polymère plastique – blanc d’œuf (en partenariat avec le Domaine des Genêts)*”, Projet étudiant (2010)
- [47] M.N. Bellon-Fontaine, “*Caractérisation physico-chimique d’échantillons de matériaux d’emballage*”, rapport reçu par l’entreprise (1999)
- [48] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, “*Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*”, Advances in Colloid and Interface Science 162 (2011) 87-106
- [49] B. Sauveur, “*Reproduction de volailles et production d’œuf*”, Michel de Reviers, Chapitre 13 (1988)
- [50] P. Reinhardt, “*Interactions intermoléculaires*”, Document de cours (Université de Paris VI)

- [51] P. Reinhardt, “*La liaisons chimique dans les solides*”, Document de cours (Université de Paris VI)
- [52] M.D. Galibert “*Biochimie structurale : des acides aminés aux protéines*” Document de cours (Université de Rennes 1)
- [53] Sally L. McArthur, “*Applications of XPS in bioengineering*”, Surf. Interface Anal. 2006; 38: 1380–1385
- [54] L.R. McDonnell , R.B Silva, R.E. Feeney, “*The sulfhydryl groups of ovalbumine*”, Arch Biochem Biophys, 32 (1951) 288 -299
- [55] M.J. Fernandez-Diez, D.T. Osuga, R.E. Feeney, “*The sulfhydryls of avian ovalbumine, bovine beta-lactoglobulin, and bovin serum albumin*”, Arch Biochem Biophys, 107 (1964) 449-458
- [56] C. Guérin-Dubiard, M. Pasco, D. Molleä, C Désert, T. Croguennec, F. Nau, « *Proteomic Analysis of Hen Egg White* », J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 3901-3910
- [57] G. Anand, S. Sharma, A.K. Dutta, S.K. Kumar, G. Belfort “*Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity*”, Langmuir 26 (2010) 10803 –10811
- [58] J. McColl, G.E. Yakubov, J.J. Ramsden, “*Complex Desorption of Mucin from Silica*”, Langmuir 23 (2007) 7096-7100
- [59] S.J. Kalista, “*Self-Healing of Thermoplastic Poly(Ethylene-co-Methacrylic Acid) Copolymers Following Projectile Puncture*”, thèse soutenue en septembre 2003, à Blacksburg dans l’Etat de Virginie.
- [60] Y. Grohens “*Surfaces Interfaces Interactions - mouillabilité - Energie de surface*”, document de cours (Université de Bretagne Sud)
- [61] J.C. Rivoal, C. Frétiigny, “*Microscopie à force atomique (AFM)* », Techniques de l’Ingénieur, Cahier R 1394
- [62] J. Requena, “*Choix de l’emballage*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Génie industriel, Cahier A 9750
- [63] P. Cognard, “*Colles et adhésifs pour emballages*”, Techniques de l’Ingénieur, Cahier AG 6751
- [64] E. Darque-Ceretti, E. Felder, J.M. Haudin, “*Etude et analyse des surfaces de polymères*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Plastiques et Composites, Techniques de l’Ingénieur, Cahier AM 3279
- [65] G. Coulon, “*Imagerie de surface de polymères : Microscopie à Force Atomique*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Plastiques et Composites, Cahier AM 3280
- [66] P. Lafon, F. Lafon, “*L’œuf et les ovoproduits*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Agroalimentaire, Cahier F 7010
- [67] D. Coulon, “*Matériaux d’emballage flexibles multicouches, modalités de choix et applications*”, Techniques de l’Ingénieur, Cahier F 1325
- [68] D. Lorient, “*Modifications biochimiques des constituants alimentaires*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Génie des procédés, Cahier F 3400

- [69] J.F. Bonnet, “*Polymères fluorés*”, Techniques de l’Ingénieur, Cahier AM 3390
- [70] M. Fontanille, Y. Gnanou, “*Structure moléculaire des polymères*”, Techniques de l’Ingénieur, Cahier AM 3037
- [71] M. Fontanille, Y. Gnanou, “*Structure moléculaire et morphologie des polymères*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Plastiques et Composites, Cahier AM 3042
- [72] M. Farré, E. Martinez, D. Barcelo, “*Techniques de détermination de composés organiques dans l’environnement*”, Techniques de l’Ingénieur, Cahier P 3820
- [73] J.C. Jammet, “*Thermoformage*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Plastiques et Composites, Cahier AM 3660
- [74] J.M. Chéron, J. Marchand, I. Treich, “*Analyse des macromolécules biologiques et applications*”, Techniques de l’Ingénieur, traité Analyse chimique et caractérisation, Cahier P 3305
- [75] E. Perez, F. Li, D. Taresté, F. Pincet, “*The Surface Force Apparatus to Reveal the Energetics of Biomolecules Assembly. Application to DNA Bases Pairing and SNARE Fusion Proteins Folding*”, Cellular and Molecular Bioengineering 1 (2008) 240–246

- Sommaire des annexes -

Annexe n°1 : Présentation des protéines du blanc d’œuf

Annexe n°2 : Représentation des spectres obtenus après la traction des films sur le blanc d’œuf

Annexe n°3 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés Organiques (table utilisée en Infrarouge)

Annexe n°1

Les protéines du blanc d'œufs [42] (1/3)

Famille	Protéine	Principales propriétés ou activités
Serpines	Ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> - phosphoglycoprotéine sensible à la dénaturation et en particulier à l'exposition à l'interface air-eau (Renault <i>et al.</i>, 2002; Lechevalier <i>et al.</i>, 2003) - transformation en S-ovalbumine au cours de la conservation (Smith et Back, 1965 ; 1968) - protéine présentant un fort caractère hydrophobe (Keshavarz et Nakai, 1979 ; Kato et Nakai, 1980) - source d'acides aminés pour le développement de l'embryon (Ibrahim, 1997) - peptides à activité immunomodulatrice (Fujita <i>et al.</i>, 1995; Fan <i>et al.</i>, 2003) - peptides à activités antimicrobienne (Pellegrini <i>et al.</i>, 2004; Biziulevicius <i>et al.</i>, 2006) et antioxydante (Hatate, 1996; Davalos <i>et al.</i>, 2004)
	Ovalbumine Y	<ul style="list-style-type: none"> - non phosphorylée (Nau <i>et al.</i>, 2005) - pas d'activité antiprotéasique démontrée à ce jour
	Ovalbumine X	<ul style="list-style-type: none"> - pas d'activité antiprotéasique démontrée à ce jour
Transferrines	Ovotransferrine	<ul style="list-style-type: none"> - glycoprotéine très thermosensible (Matsuda <i>et al.</i>, 1981 ; Yamashita <i>et al.</i>, 1998) - fixe les ions métalliques et en particulier le fer (Mason <i>et al.</i>, 1996) - activité antimicrobienne (Garibaldi, 1970; Bullen <i>et al.</i>, 1978; Valenti <i>et al.</i>, 1983; Baron <i>et al.</i>, 1997), bactéricide (Ibrahim <i>et al.</i>, 2000; Aguilera <i>et al.</i>, 2003) - activité antioxydante (Li-Chan et Nakai, 1989; Roxborough <i>et al.</i>, 1995) - activités antivirale (Giansanti <i>et al.</i>, 2002), antifongique (Valenti <i>et al.</i>, 1985), et immunomodulatrice (Hirota <i>et al.</i>, 1995; Otani et Odashima, 1997; Rada <i>et al.</i>, 2001; Xie <i>et al.</i>, 2002) - peptides à activité antihypertensive (Lee <i>et al.</i>, 2006)
Antiprotéases	Ovomucoïde	<ul style="list-style-type: none"> - glycoprotéine fortement glycosylée aux propriétés antiprotéasiques et notamment anti-trypsiniques (Kato <i>et al.</i>, 1987) - résistante aux traitements thermiques à pH acide (Lineweaver et Murray, 1947) - caractère allergène (Cook et Sampson, 1997), activité antimicrobienne (Miyake <i>et al.</i>, 2000), peptides à activité immunomodulatrice (Holen <i>et al.</i>, 2001)
	Ovo-inhibiteur	<ul style="list-style-type: none"> - antiprotéase à large spectre d'action (Tomimatsu <i>et al.</i>, 1966; Feeney, 1971; Gertler et Feinstein, 1971; Vered <i>et al.</i>, 1981) - activités antivirale, anti-inflammatoire et anti-mutagène (Yolken <i>et al.</i>, 1987; Frenkel <i>et al.</i>, 1987)

Annexe n°1

Les protéines du blanc d'œufs [42] (2/3)

Antiprotéase	Ovostatine	stromelysine) (Réhault, 2007a) – activités antimicrobienne (Molla <i>et al.</i> , 1987), anti-inflammatoire et anticancéreuse (rapporté par Mine et Kovacs-Nolan, 2004)
	Cystatine	– protéine de faible masse moléculaire, inhibiteur de protéases à cystéine (Fossum et Whitaker, 1968; Anastasi <i>et al.</i> , 1983; Machleidt <i>et al.</i> , 1989; Bjork et Ylinenjärvi, 1990) – activités antimicrobienne (Bjork, 1990; Blankenvoorde <i>et al.</i> , 1996; Nakai, 2000), bactéricide (Wesierska <i>et al.</i> , 2005), anticancéreuse (Muehlenweg <i>et al.</i> , 2000; Krol <i>et al.</i> , 2003a, b), antivirale (Korant <i>et al.</i> , 1985; Ebina et Tskada, 1991)
Glycosyl – hydrolases	Lysozyme	– protéine fortement basique existant sous deux formes : non glycosylée (forme majoritaire) et glycosylée (forme secondaire) (Trudel et Asselin, 1995) – enzyme de type neuraminidase, activité lytique contre peptidoglycane des parois de bactéries – activités antimicrobienne et antivirale – activité antioxydante (Liu <i>et al.</i> , 2006) – nombreuses applications (conservateurs en agroalimentaire et utilisations pharmaceutiques) (Sava, 1996)
Mucines	Ovomucine α -ovomucine β -ovomucine	– glycoprotéine de très haut poids moléculaire responsable de l'aspect visqueux du blanc d'œuf – barrière physique vis-à-vis des contaminations, rôle de protection de l'embryon – protéine difficile à analyser en raison de son caractère insoluble après extraction – activité anticancéreuse (Ohami <i>et al.</i> , 1993; Yokota <i>et al.</i> , 1999a, b), peptide anticancéreux (Watanabe <i>et al.</i> , 1998a; Oguro <i>et al.</i> , 2001) – activité antivirale (Gottschalk et Lind, 1949; Tsuge <i>et al.</i> 1996a, b; 1997a, b; Watanabe <i>et al.</i> , 1998b) – activité immunomodulante (Tanizaki <i>et al.</i> , 1997), activité hypocholestérolémiant (Nagaoka <i>et al.</i> , 2002) – peptides à activité antibactérienne (Kobayashi <i>et al.</i> , 2004)
Lipocalines	Ovoglycoprotéine	– interaction avec les petites molécules hydrophobes – utilisation en tant que détecteur ou phase stationnaire en chromatographie liquide pour séparer les énantiomères chiraux de molécules (Sadakane <i>et al.</i> , 2002 ; Fu et He, 2005)
	Ch21	– rôle dans le développement de l'embryon (différenciation des chondrocytes et myoblastes) et dans la survie de l'embryon (transport d'acides gras) (Descalzi-Cancedda <i>et al.</i> , 2001; Gentili <i>et al.</i> , 2005)
	Cal-gamma	– rôle dans le développement de l'embryon (formation des os) (Pagano <i>et al.</i> , 2002)

Annexe n°1

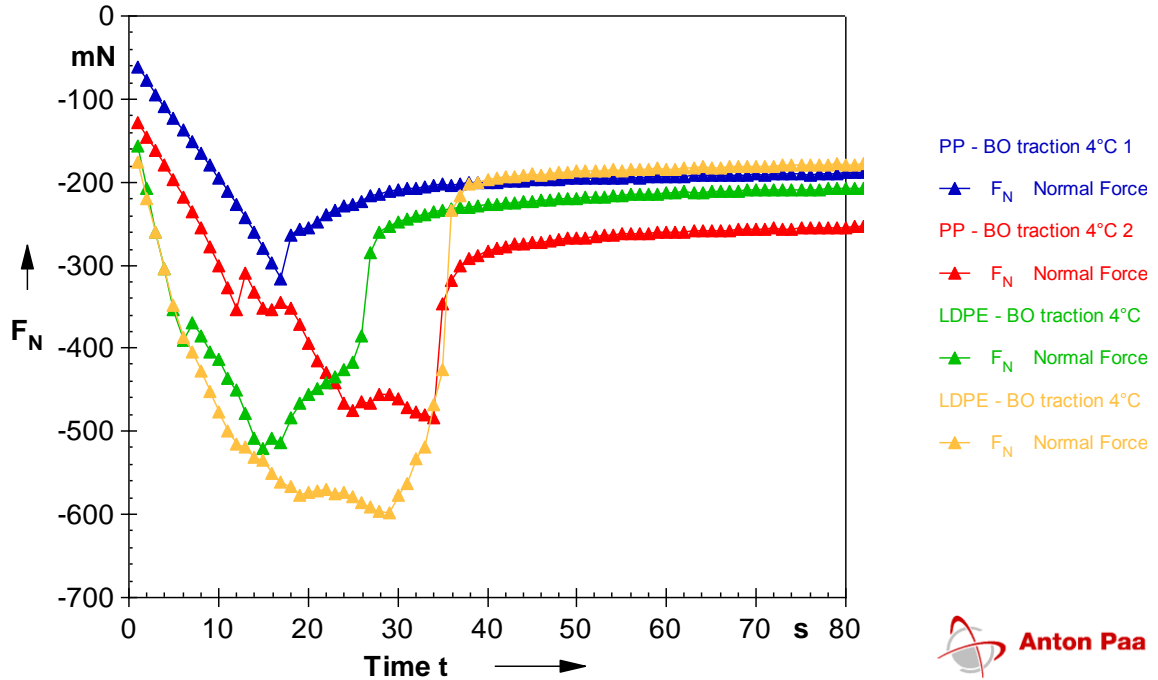
Les protéines du blanc d'œufs [42] (3/3)

Famille	Protéine	Principales propriétés ou activités
Folates receptors	Flavoprotéine (RBP)	<ul style="list-style-type: none"> - existe dans le blanc et dans le jaune mais diffère par la composition en sucres (Hamazune et al., 1984) - capacité de fixation de la riboflavine (vitamine B₂), rôle de transport et stockage d'ions métalliques dans l'œuf (Smith et al., 2006) - stabilité thermique de la forme apoprotéine (Wasylewski, 2000), augmente la stabilité à la lumière de la vitamine B2 après fixation à la protéine (Zhong et Zewail, 2001)
Avidine streptavidine	Avidine	<ul style="list-style-type: none"> - glycoprotéine basique, très forte affinité pour la biotine (vitamine H ou B₈) (Green, 1975); nombreuses applications biochimiques et biotechnologiques (Wilchek et Bayer, 1999 ; Nau et al., 2007b) - activité antimicrobienne (Green, 1975; Korpela et al., 1983; Korpela et al., 1984; Banks et al., 1986) - applications thérapeutiques dans le traitement contre le cancer (Moro et al., 1997; Corti et al., 1998; Gasparri et al., 1999; Bickel et al., 2001; Hytonen et al., 2003)
Bactericidal Permeability-Increasing Protein (BPI)	Tenp	<ul style="list-style-type: none"> - homologie de séquence avec les protéines de la famille des BPI, responsables de la destruction de la membrane interne des bactéries (Elsbach et Weiss, 1998; Bingle et Craven, 2004) - potentielle activité antimicrobienne
Clustérines	Clustérine	<ul style="list-style-type: none"> - protéine chaperonne - protège de l'agrégation et de la précipitation de protéines observées dans les maladies d'Alzheimer, Creutzfeld-Jacob et Parkinson (Poon et al., 2002)
UPAR/CD59/Lys6	HEP21	<ul style="list-style-type: none"> - aucune fonction connue
Protéases	Glutamyl aminopeptidase	<ul style="list-style-type: none"> - métalloprotéase; activité stimulée par les ions Ca²⁺ et Mn²⁺ et inhibée par Zn²⁺ et Co²⁺ (Petrovic et Vitale, 1990)
	Méthionine aminopeptidase (MAP)	<ul style="list-style-type: none"> - métalloprotéase (Skrtec et Vitale, 1994)
	Métalloprotéase 2 (MMP-2)	<ul style="list-style-type: none"> - métalloprotéase (Réhault-Godbert et al., 2008) - impliquée dans la morphogénèse et l'angiogénèse (Stilletti et al., 2001; Curry et Osteen, 2003)
Autres protéines mineures	Ovosécrotoglobuline	<ul style="list-style-type: none"> - pas de fonction connue
	Gallin	<ul style="list-style-type: none"> - pas de fonction connue
	...	

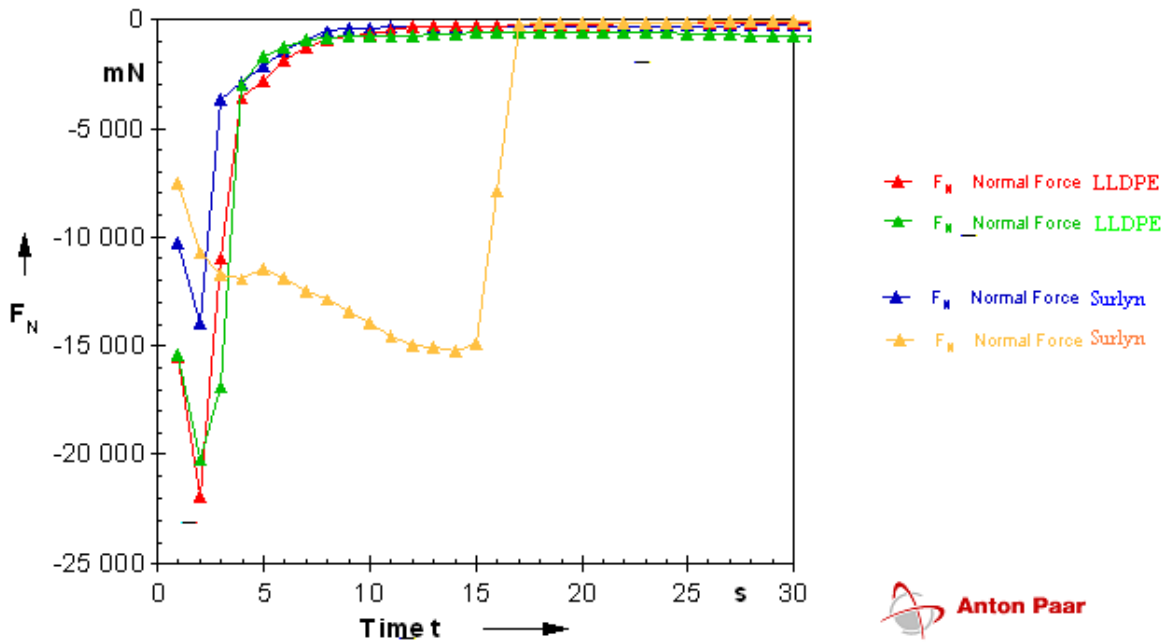
Annexe n°2

Spectres représentant la traction des films sur du blanc d'œuf

Résultat en Traction : Comparaison entre le LDPE et le PP



Résultat en Traction : Comparaison entre le LLDPE et le Surlyn supérieur



Annexe n°3

Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées
dans les composés organiques

Composé	Vibrations caractéristiques	Fréquence de vibration (cm ⁻¹)
Alcane	CH _x <i>stretching</i>	2950-2850
	CH _x <i>déformation</i>	1500-1400
Insaturé	CH _x <i>stretching</i>	3050-3000
	C=C <i>stretching</i>	1600-1500
	Aromatique substitué (CH)	1900-1700
	Aromatique <i>bending</i>	800-750
Alcool	OH <i>stretching</i>	3400 (large)
	C-O <i>stretching</i>	1050-1250
	OH <i>déformation</i>	(1 ^{aire} < 2 ^{aire} < 3 ^{aire} < Phénol)
Cétone	C=O <i>stretching</i>	1690-1680
Aldéhyde	H-C=O	2800-2650
	C=O <i>stretching</i>	1710-1700
Acide	OH (avec liaison hydrogène)	3200-2500 (large)
	C=O <i>stretching</i>	1725-1700
	C-O	1440-1395, 1320-1210
	OH <i>déformation</i>	950-900
Sel de l'acide	COO ⁻ <i>stretching antisymétrique</i>	1615-1650
	COO ⁻ <i>stretching symétrique</i>	1400-1300
Ester	C=O	1775-1720
	Aromatique	1250-1100
Amine	NH <i>stretching</i>	3400-3300 (1 ^{aire} > 2 ^{aire})
	NH <i>déformation</i>	1650-1550 (1 ^{aire} > 2 ^{aire} > Arom.)
	C-N <i>stretching</i>	1350-1250 (1 ^{aire} < 2 ^{aire} < Arom.)
Amide	NH <i>stretching</i>	3350-3070 (1 ^{aire} > 2 ^{aire})
	C=O	1680-1630
	NH <i>déformation</i>	1650-1515 (1 ^{aire} > 2 ^{aire})
	C-N <i>stretching</i>	1180-1040 (1 ^{aire} < 2 ^{aire})
Nitrile	C≡N	2250
Isocyanate	N=C=O	2275
Sulfone	S=O	1100-1000
	C-S <i>stretching</i>	740-690
	SO ₂	1380-1300
Halogénure	C-F	1400-1000
	C-Cl	1175-650
	C-Br	590-510
	C-I	525-485