HAL open science

Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : Interactions, structuration, modélisation

Antoine Bouchoux

To cite this version:

Antoine Bouchoux. Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : Interactions, structuration, modélisation. Génie des procédés. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2017. tel-01891464

HAL Id: tel-01891464

https://hal.science/tel-01891464v1

Submitted on 9 Oct 2018

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.

Université Toulouse III Paul Sabatier
Habilitation à diriger des recherches

Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : Interactions, structuration, modélisation

De la filtration du lait à la déconstruction de la biomasse lignocellulosique

Antoine Bouchoux
Chargé de recherche INRA
Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés / LISBP
UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA
Toulouse

Présentée à Toulouse le 05 juillet 2017 devant le jury composé de :

. Bernard Cathala, directeur de recherche INRA, INRA Nantes (Rapporteur)
. Bernard Cuq, professeur des Universités, Université de Montpellier (Rapporteur)
. Arnaud Saint-Jalmes, directeur de recherche CNRS, Université Rennes 1 (Rapporteur)
. Patrice Bacchin, professeur des Universités, Université Toulouse III
. Arnaud Cockx, professeur INSA, INSAT
. Marie-Hélène Morel, directrice de recherche INRA, Université de Montpellier

Sommaire

Sigles et abréviations 9

1 Formation et parcours 11
Toulouse → Rennes → Toulouse

1.1 Parcours universitaire et de chercheur 11
1.2 Publications 13
1.3 Encadrement 17
1.4 Implication dans des programmes de recherche financés 23
1.5 Animation de la recherche, responsabilités collectives 25

2 Activités de recherche 29
Procédés de filtration, micelle de caséine... et matière molle

2.1 Mécanismes de sélectivité de membranes synthétiques et biologiques 29
2.2 Comprendre et modéliser la filtration du lait 35
2.2.1 Problématique et stratégie adoptée 35
2.2.2 Suspensions concentrées de micelles de caséine 39
2.2.3 Description et modélisation de la filtration 53
2.3 Structure de la micelle de caséine 59
2.4 Interactions et structuration aux fortes concentrations 63
2.4.1 Protéines globulaires 63
2.4.2 Microgels 65

3 Perspectives de recherche 69
Catching enzymes in action: Soft matter approaches to enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass

3.1 Contexte et questions 69
3.2 Approche expérimentale et conceptuelle 75
3.3 Moyens 87

4 Conclusion 89

5 Références 91

Annexes 101

A Curriculum vitæ 103
B Autres produits de la recherche : séminaires, publications à diffusion restreinte 107
C Copie de 5 publications significatives 121
C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009 123
C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010 147
C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012 175
C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014 189
C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016 207

Sigles et abréviations

AFM	Microscopie à force atomique
AMC2	GdR CNRS 2980 approches multi-physiques pour les colloïdes concentrés
ANR	Agence nationale de la recherche
ANS	Programme d'actions nouvelles soutenues du département CEPIA
BBA	Bretagne biotechnologie alimentaire, association d'industriels laitiers
BSA	Bovine serum albumin
CBM	Carbohydrate binding module
CEPIA	Département INRA caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture
CIRIMAT	Centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux, UMR 5085 INP-CNRS-UPS, Toulouse
CNRS	Centre national de la recherche scientifique
CPER	Contrat de plan État-région
CR2	Chargé de recherche 2ème classe
DR	Directeur de recherche
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ENSIC	Ecole nationale supérieure des industries chimiques, Nancy
EUDIME	Programme européen erasmus mundus doctorate in membrane engineering
FAST	Laboratoire fluides, automatique et systèmes thermiques, UMR 7608 CNRS-Université de Paris-Sud, Orsay
FERMaT	Fédération de recherche fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GIMD	Département génie des interfaces et des milieux divisés du LGC
ILL	Institut Laue-Langevin, Grenoble
IMFT	Institut de mécanique des fluides, UMR 5502 INP-CNRS-UPS, Toulouse
INRA	Institut national de la recherche agronomique
INSA	Institut national des sciences appliquées
INP	Institut national polytechnique de Toulouse
IPR	Institut de physique de Rennes, UMR 6251 CNRS-Université Rennes 1, Rennes
IRSTEA	Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
ITAV	Institut des technologies avancées en sciences du vivant, USR 3505 CNRS, Toulouse
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
JCJC	Programme jeunes chercheuses et jeunes chercheurs de l'ANR
LAAS	Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, UPR 8001 CNRS, Toulouse
LAPLACE	Laboratoire plasma et conversion d'énergie, UMR 5213 INP-CNRS-UPS, Toulouse
L2C	Laboratoire Charles Coulomb, UMR 5221 CNRS-Université Montpellier, Montpellier
LGC	Laboratoire de génie chimique, UMR 5503 INP-CNRS-UPS, Toulouse
LISBP	Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA, Toulouse
MEB	Microscopie électronique à balayage
MF	Microfiltration
NHS	*N*-hydroxysuccinimide

NPC	Nuclear pore complex
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PNiPAM	Poly(*N*-isopropylacrylamide)
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPI	Rensselaer polytechnic institute, Troy, NY, USA
SANS	Small-angle neutron scattering
SAXS	Small-angle x-ray scattering
SEC-MALS	Chromatographie d'exclusion de taille avec détection par diffusion de la lumière à plusieurs angles
SEVAB	Ecole doctorale sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques, bioingénierie, université Paul Sabatier, INP Toulouse, INSA Toulouse
SPR	Technique de résonance des plasmons de surface
STLO	Laboratoire science et technologie du lait et de l'œuf, UMR 1253 INRA-AGROCAMPUS OUEST, Rennes
TIM	Equipe transfert, interface, mélange du LISBP
TIPIL	Equipe procédés pour l'industrie laitière du STLO
TWB	Toulouse white biotechnology, UMS 1337/3582 INRA-CNRS-INSA, Toulouse
UF	Ultrafiltration
UMET	Unité matériaux et transformations, UMR 8207 CNRS-université Lille 1
UMR	Unité mixte de recherche
UMS	Unité mixte de service
UPS	Université Paul Sabatier, Toulouse
USR	Unité de service et de recherche
UTWENTE	Université de Twente, Pays-Bas
WUR	Université de Wageningen, Pays-bas

1 Formation et parcours

Toulouse → Rennes → Toulouse

1.1 Parcours universitaire et de chercheur

Mon parcours scientifique, sans être véritablement atypique, est riche en évènements et changements de différentes natures. Je le résume rapidement ci-dessous. Ses grandes lignes sont données dans mon CV en annexe A.

A l'issue de deux années de classes préparatoires aux grandes écoles à Orsay, j'ai intégré l'ENSIC de Nancy pour y suivre une formation d'ingénieur en génie des procédés. Ma formation à la recherche a commencé en DEA (diplôme d'études approfondies) en dernière année de cette école en 2001. Mon projet de recherche était alors - de façon toute fortuite - lié à des thématiques que j'allais aborder plus tard comme chercheur puisqu'il s'agissait de contribuer au meilleur fonctionnement d'une ligne de production de munster en Lorraine (!). A la suite de cette première expérience, je me suis engagé dans un travail de thèse en génie des procédés au LGC de Toulouse sous la direction d'Hélène Roux-de Balmann et financé par le CNRS et l'entreprise Eurodia. Le projet reposait essentiellement sur des problématiques industrielles d'intégration d'une opération de filtration, la nanofiltration, dans les procédés de production d'acide lactique. Il s'est avéré également passionnant du point de vue scientifique avec la mise en évidence de phénomènes de sélectivité jusqu'alors peu connus en filtration membranaire. Après la thèse, j'ai rejoint le groupe de Georges Belfort aux Etats-Unis (RPI) pour un séjour postdoctoral. Le lien avec la filtration membranaire était ténu et le contraste avec mon travail de thèse à peu près total. Mon travail consistait en effet à étudier les mécanismes de sélectivité d'une machine biologique macromoléculaire, le *nuclear pore complex*, par microscopie à force atomique. Ce fut là mon premier contact avec des objets protéiques et des approches de type biophysique. L'expérience fut réellement enrichissante. Mais elle est restée relativement brève (9 mois) suite à mon succès au concours INRA quelques mois après mon arrivée aux Etats-Unis.

Admis au concours d'entrée 2005, je suis rentré à l'INRA le 1er janvier 2006 en tant que CR2 au laboratoire STLO à Rennes. L'idée de ce recrutement était de renforcer les activités filtration du STLO alors portées par une seule scientifique, Geneviève Gésan-Guiziou. L'objectif scientifique était de parvenir à maitriser les opérations de filtration membranaire utilisées dans les industries laitières, avec la volonté de modéliser et de prédire leur fonctionnement. J'ai choisi d'aborder cette problématique à travers une caractérisation fine des phénomènes d'interactions et de structuration dans les solutions concentrées de protéines laitières que l'on retrouve à la surface des membranes de filtration. Ma conviction était alors - et est encore - qu'une caractérisation de ce type, aux petites échelles (du nm au micron), était indispensable pour décrire et modéliser le procédé de façon efficace et réaliste. Cette démarche, complémentaire des approches classiques en génie des procédés, était alors relativement novatrice au STLO. Elle nécessitait de se confronter et de s'ouvrir à des notions de physique des colloïdes et de la matière molle qui m'étaient peu familières à mon arrivée à Rennes. J'y suis parvenu en particulier grâce au *mentorship* précieux et bienveillant de Bernard Cabane, chercheur à l'ESPCI, et à l'accompagnement de certains chercheurs du STLO dont Stéphane Pezennec (INRA). J'ai développé mon programme de recherche alliant génie des procédés et physique des colloïdes pendant près de six années au STLO de 2006 à 2011. Au cours de cette

période, mes collègues (dont Peng Qu, doctorant 2009-2012) et moi-même avons démontré que l'approche était pertinente avec de premiers résultats importants quant au comportement de la micelle de caséine, protéine majoritaire du lait, aux fortes concentrations. Sur cette même période, j'ai également travaillé à l'élucidation de la structure interne de la micelle de caséine et à la caractérisation des interactions entre protéines globulaires aux fortes concentrations, toujours par des approches de type (bio-)physique.

En juin 2011, j'ai souhaité effectuer une mobilité de Rennes vers Toulouse pour raison familiale. Cette mobilité m'a été accordée dans le cadre d'une convention d'accueil entre le STLO, le LGC, et le LISBP. Cette convention prévoyait (i) un accueil au LGC d'octobre 2011 à octobre 2013 tout en restant affecté au STLO, (ii) mon affectation au LISBP le 1er octobre 2013. L'objectif de ce "retour" de deux ans au LGC était de finaliser mes travaux sur la filtration du lait et les liens entre propriétés colloïdales de la matière et modélisation du procédé. Le choix du LGC était en ce sens stratégique puisque ce laboratoire est historiquement impliqué dans des approches combinant génie des procédés et physique de la matière molle à travers les travaux de Martine Meireles (CNRS) et Patrice Bacchin (UPS) notamment. En plus de valoriser certains travaux démarrés au SLTO, mon passage au LGC m'a d'ailleurs permis de travailler à la modélisation de la filtration du lait en collaboration avec P. Bacchin et à partir de modèles que ce dernier a contribué à faire émerger. Par ailleurs, c'est au cours de ces deux années que Martine Meireles et moi-même avons commencé à travailler sur le comportement générique en filtration d'objets poreux et déformables de type microgel. Ce travail s'est concrétisé par une thèse en codirection qui a démarré fin 2013 (Izabella Bouhid de Aguiar).

J'ai donc intégré le LISBP le 1er octobre 2013. J'y ai rejoint l'équipe TIM dont les recherches relèvent du génie des procédés et plus particulièrement de la mécanique des fluides, de la modélisation des procédés et de la physico-chimie. Comme convenu avec l'INRA/CEPIA, le STLO et le LISBP, cette nouvelle affectation devait nécessairement s'accompagner d'un changement de thématique : la thématique de la filtration du lait ne pouvant être traitée en dehors du STLO, et le LISBP n'ayant pas vocation à s'intéresser à de telles problématiques. Le choix de cette nouvelle thématique me revenait complètement et j'ai décidé de m'orienter vers des questions relevant de la valorisation de la biomasse lignocellulosique et des procédés de dégradation enzymatique de la lignocellulose. Il me semblait en effet que les techniques et approches que j'avais utilisées et développées au STLO et au LGC pouvaient permettre de mieux appréhender certains mécanismes élémentaires de la dégradation d'un substrat par des enzymes. Depuis mon affectation au LISBP, l'objectif essentiel de mes recherches est de caractériser l'action d'enzymes lignocellulolytiques dans des situations modèles reproduisant une ou plusieurs caractéristique(s) d'un substrat complexe lignocellulosique. La démarche est la même que celle adoptée pour comprendre la filtration d'un lait. Il s'agit de caractériser le système en cours de transformation, aux petites échelles (du nm au micron), et en termes de structure, interactions, et propriétés mécaniques. L'idée est ensuite de revenir au procédé enzymatique en tant que tel et d'utiliser ses informations pour mieux le décrire, le modéliser, et en proposer des voies d'amélioration. Je travaille sur ce projet en collaboration avec des chercheurs du LISBP spécialisés en ingénierie enzymatique, Claire Dumon et Cédric Montanier, tous deux CR INRA. C. Dumon et moi-même encadrons depuis septembre 2016 le travail d'une doctorante INRA-Région Occitanie sur le sujet, Lucie Dianteill. Enfin, en dehors de cette thématique principale, je conserve bien sûr un intérêt pour mes thématiques précédentes et continue de collaborer sur des questions diverses avec des collègues du STLO, du LGC et d'autres laboratoires.

1.2 Publications

Je suis l'auteur ou le co-auteur de 16 articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture dont 8 en tant que premier auteur et 12 en tant qu'auteur correspondant. Au 1er mars 2017, ces articles ont reçus 360 citations selon ISI Web of Science (http://www.researcherid.com/rid/E-9111-2010) et 476 selon Google Scholar (https://scholar.google.fr/citations?user=B30sftYAAAAJ). Le *h-index* - indicateur à la signification toute relative - est de 10 dans les deux cas.

Ces articles sont listés ci-dessous avec également les articles publiés dans des revues nationales à comité de lecture et les articles soumis ou en préparation. Mes communications dans des congrès et colloques sous la forme de présentations orales (27 au total) et de posters (23) sont données en annexe B.

Mon implication a toujours été importante voire centrale dans l'ensemble des travaux cités ci-dessous. Je ne recense qu'un article (AI7) en marge de mes activités principales et pour lequel ma participation s'est limitée à la réalisation et l'interprétation d'expériences AFM. Dans les autres cas, je suis soit à l'origine des travaux publiés, soit partie prenante des projets, avec toujours l'implication qu'il se doit dans l'analyse des résultats, leur interprétation et la rédaction des articles. Il s'agit je pense d'une caractéristique essentielle et relativement singulière de ma production scientifique.

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

AI16 *How molecular crowding enhances protein stabilization of amorphous calcium orthophosphate: the casein case*
P. De Sa Peixoto*[a], J. Valle Costa Silva, G. Laurent, M. Schmutz, D. Thomas, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou*
Langmuir, vol.33(5), p.1256-1264, 2017
http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04235

AI15 *Osmotic pressures of lysozyme solutions from gas-like to crystal state*
C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pezennec*
Physical Chemistry Chemical Physics, vol.18(41), p.28458-28465, 2016
http://dx.doi.org/10.1039/c6cp03867k

AI14 *Diffusion and partitioning of macromolecules in casein microgels: evidence for size-dependent attractive interactions in a dense protein system*
P. De Sa Peixoto*, **A. Bouchoux***, S. Huet, M.-N. Madec, D. Thomas, J. Floury, G. Gésan-Guiziou*
Langmuir, vol.31(5), p.1755-1765, 2015
http://dx.doi.org/10.1021/la503657u

[a]Les astérisques signalent le ou les auteurs correspondants

AI13 *Structural heterogeneity of milk casein micelles: a SANS contrast variation study*
A. Bouchoux*, J. Ventureira, G. Gésan-Guiziou, F. Garnier-Lambrouin, P. Qu, C. Pasquier, S. Pezennec, R. Schweins, B. Cabane
Soft Matter, vol.11, p.389-399, 2015
http://dx.doi.org/10.1039/c4sm01705f
[correction : http://dx.doi.org/10.1039/C4SM90166E]

AI12 *On the cohesive properties of casein micelles in dense systems*
P. Qu, **A. Bouchoux***, G. Gésan-Guiziou
Food Hydrocolloids, vol.43, p.753-762, 2015
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.005

AI11 *A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids: the Milk example*
A. Bouchoux*, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou, Langmuir, vol.30(1), p.22-34, 2014
http://dx.doi.org/10.1021/la402865p

AI10 *Molecular mobility in dense protein systems: an investigation through ^{1}H NMR relaxometry and diffusometry*
A. Bouchoux*, D. Schorr, A. Daffé, M. Cambert, G. Gésan-Guiziou, F. Mariette
Journal of Physical Chemistry B, vol.116, p.11744-11753, 2012
http://dx.doi.org/10.1021/jp306078k

AI9 *Dead-end filtration of sponge-like colloids: the case of casein micelle*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou*, **A. Bouchoux***
Journal of Membrane Science, vols.417-418, p.10-19, 2012
http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.06.003

AI8 *AFM imaging of milk casein micelles: evidence for structural rearrangement upon acidification*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h*, **A. Bouchoux***
Langmuir, vol.28(11), p.4915-4919, 2012
http://dx.doi.org/10.1021/la3001448

AI7 *Contribution of surface β-glucan polysaccharide to physicochemical and immunomodulatory properties of Propionibacterium freudenreichii*
S.-M. Deutsch*, S. Parayre, **A. Bouchoux**, F. Guyomarc'h, J. Dewulf, M. Dols-Lafargue, F. Baglinière, F. Cousin, H. Falentin, G. Jan, B. Foligné
Applied and Environmental Microbiology, vol.78(6), p.1765-1775, 2012
http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07027-11

AI6 *Ionic strength dependence of skimmed milk microfiltration: relations between filtration performance, deposit layer characteristics and colloidal properties of casein micelles*
A.J.E. Jimenez-Lopez*, N. Leconte, F. Garnier-Lambrouin, **A. Bouchoux**, F. Rousseau, G. Gésan-Guiziou*
Journal of Membrane Science, vol.369(1-2), p.404-413, 2011
http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.12.026

AI5 *How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study*
A. Bouchoux*, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane*
Biophysical Journal, vol.99(11), p.3754-3762, 2010
http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019

AI4 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux*, B. Debbou, G. Gésan-Guiziou, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
Journal of Chemical Physics, vol.131(16), p.165106, 2009
http://dx.doi.org/10.1063/1.3245956

AI3 *Casein micelles dispersions under osmotic stress*
A. Bouchoux*, P.-E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane
Biophysical Journal, vol.96(2), p.693-706, 2009
http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.006
[correction : http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.006]

AI2 *Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations*
A. Bouchoux*, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Separation and Purification Technology, vol.52(2), p.266-273, 2006
http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2006.05.011

AI1 *Nanofiltration of glucose and sodium lactate solutions: variations of retention between single- and mixed-solute solutions*
A. Bouchoux*, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Journal of Membrane Science, vol.258(1-2), p.123-132, 2005
http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2005.03.002

Articles publiés dans des revues nationales à comité de lecture (AN)

AN3 *Modeling the filtration of soft and permeable colloids: the milk case study*
A. Bouchoux*, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.104-2013, 2013

AN2 *Impact de la force ionique en filtration de lait : analyse des caractéristiques des micelles de caséines et des dépôts*
G. Gésan-Guiziou*, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.98-2009, 2009

AN1 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques reposant sur une étape d'électrodialyse à membranes bipolaires*
A. Bouchoux*, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.89-2003, p.75-82, 2003

Article soumis

AS1 *Proteins for the future: a soft matter approach to link basic knowledge and innovative applications*
A. Boire, **A. Bouchoux**, S. Bouhallab, A.-L. Chapeau, T. Croguennec, V. Ferraro, V. Lechevalier, P. Menut, S. Pézennec, D. Renard, V. Santé-Lhoutellier, K. Laleg, V. Micard, A. Riaublanc, M. Anton*
Soumis à Innovative Food Science and Emerging Technologies, fév.2017

Articles en préparation

AP1 *Microgel packings under pressure: Microscale structure and compressive resistance*
I. Bouhid de Aguiar, K. Schroën, M. Meireles*, **A. Bouchoux***
Soumission probable à Colloids and Surfaces A

AP2 *Soft matter approaches to food proteins*
A. Boire*, **A. Bouchoux**, S. Bouhallab, T. Croguennec, V. Lechevalier, P. Menut*, S. Pézennec, D. Renard
Soumission probable à Annual Review of Food Science and Technology

AP3 *Asymmetric binding of Na^+ and Cl^- with charged groups of ovalbumin and lysozyme modulates their associative properties at the air-water interface*
C. Pasquier, L.-T. Lee, B. Cabane, **A. Bouchoux**, V. Lechevalier, M. Pasco, S. Pezennec*, S. Beaufils*

AP4 *Osmotic pressure and structure of ovalbumin solutions*
C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pezennec*

AP5 *A tailored and non-altering enzyme immobilization approach to explore plant biomass deconstruction*
C. Montanier*, **A. Bouchoux**
Soumission probable à Biomacromolecules

1.3 Encadrement

Codirection de thèses

Je suis à l'origine des sujets des deux thèses que je codirige actuellement et de celle que j'ai codirigée au STLO. Je suis ou étais dans tous les cas l'interlocuteur principal du doctorant sur les aspects scientifiques.

Lucie Dianteill, sept. 2016 - sept. 2019 (en cours)
Cinétiques enzymatiques aux interfaces et en milieu confiné : cas de la biomasse lignocellulosique
Thèse de doctorat de l'INSA Toulouse
Financement : INRA/CEPIA, Région Midi-Pyrénées/Occitanie, équipe TIM
Responsabilité : codirection avec Claire Dumon (LISBP)
Travaux associés : séminaire S31, poster P21[b]
Ce projet vise à caractériser l'action d'enzymes lignocellulolytiques dans des situations modèles de confinement ou d'interface. Les moyens mis en œuvre sont principalement ceux de la physico-chimie et de la physique de la matière molle, avec une caractérisation des processus et des structures aux petites échelles (du nm au micron). Ces travaux se fondent en partie sur les résultats des stages de Master de Lucie Dianteill et Amal Zeidi. Ils bénéficient d'un soutien de l'INRA et de la région Occitanie pour le salaire de Lucie, et d'un soutien direct de mon équipe d'accueil au LISBP pour les frais de fonctionnement. Cette thèse est un appui essentiel à mes projets et perspectives de recherche au LISBP (partie 3).

Izabella Bouhid De Aguiar, nov. 2013 - oct. 2017 (en cours)
Filtration and compression of deformable and porous microparticles
Thèse de doctorat en cotutelle entre l'UPS, UTwente (Pays-Bas) et WUR (Pays-Bas)
Financement: Union européenne via le programme EUDIME
Responsabilité : codirection avec M. Meireles (LGC)
Travaux associés : article en préparation AP1, communication C26, posters P23 et P22, séminaires S27 et S26
Ce projet a pour origine le travail de stage de Florian Lange que j'ai encadré avec M. Meireles lors de mon accueil au LGC et qui consistait à suivre l'accumulation de microgels à la surface d'une membrane. L'idée plus générale du travail d'Izabella est de caractériser la structure et la résistance à la compression de suspensions concentrées de microgels. Les microgels sont des objets modèles qui ont la propriété d'être à la fois déformables et poreux, ce qui correspond à de nombreux objets que l'on retrouve dans l'industrie dont la micelle de caséine par exemple. En étudiant les microgels, l'objectif est d'aller au-delà de la problématique spécifique de la filtration du lait et de tenter de décrire le comportement générique de tels objets lorsqu'ils sont soumis à des opérations de concentration de type filtration, évaporation ou séchage (partie 2.4.3). Le financement de la thèse d'Izabella est assuré par l'Union européenne dans le cadre d'un programme dédié aux procédés de filtration membranaire. En plus de son accueil dans un laboratoire hôte (le LGC Toulouse en l'occurrence) et comme le demande l'Europe pour ce programme, Izabella a effectué deux mobilités de 6 mois dans des universités européennes, UTwente et WUR en l'occurrence. A WUR, Izabella a

[b]Les communications, séminaires et posters sont listés en annexe B

travaillé avec Karin Schröen et Joris Sprakel, deux chercheurs qui ont récemment développé des approches expérimentales inédites pour la visualisation du comportement de particules en compression par centrifugation et filtration. Pour des raisons de montage administratif, il est convenu qu'Izabella soutienne sa thèse à WUR selon les modalités de cette université. La soutenance aura lieu en septembre-octobre 2017.

Peng Qu, oct. 2009 - oct. 2012
Filtration de dispersions de micelles de caséine : propriétés du dépôt, interactions colloïdales et modélisation
Thèse de doctorat de l'AGROCAMPUS-OUEST
Financement : INRA/CEPIA et Région Bretagne
Responsabilité : codirection avec G. Gésan-Guiziou (STLO)
Travaux associés : articles AI13, AI12, AI11, AI9, AN3, communications C27, C23, C22, C20, C16, posters P18, P15, P13, séminaires S25 et S20
Il s'agit de ma première thèse en codirection. L'objectif du travail de Peng était de faire le lien entre la filtration membranaire d'un lait et les propriétés de structure et d'interaction de suspensions concentrées de micelles de caséines telles que je les caractérisais par ailleurs avec des collègues et stagiaires. Peng a essentiellement travaillé sur l'aspect génie des procédés de mon projet au STLO (partie 2.2), avec des publications qui portent majoritairement sur la description et la modélisation de la filtration. Il a également participé à de premiers travaux visant à caractériser la nature des forces d'adhésion entre micelles de caséine quand on les force au contact. L'association Bretagne biotechnologie alimentaire (BBA) qui regroupe l'ensemble des organismes de recherches et des professionnels laitiers du grand ouest (Lactalis, Bel, Danone,...) a participé au comité de thèse de Peng. Un des objectifs du travail était en effet de parvenir à tirer de premières recommandations pour la conduite optimale de la filtration d'un lait écrémé (article AI11). Il nous semblait important de partager ces informations avec les industriels de façon à les convaincre que les approches nouvellement développées au STLO étaient pertinentes. BBA a ensuite participé au financement du postdoctorat de Paulo De Sa Peixoto (cf page suivante). Peng a été embauché en décembre 2014 par le groupe Yili en Chine, industriel laitier et acteur majeur de l'agroalimentaire dans ce pays. Il y travaille en tant qu'ingénieur recherche et développement en poste à Pékin actuellement.

Participation à des thèses de façon non-formalisée

J'ai participé au STLO aux travaux de deux doctorantes, à des degrés divers d'implication.

Coralie Pasquier, 2011-2014
Adsorption aux interfaces et compression osmotique : deux voies de confinement des protéines en phase aqueuse
Thèse de doctorat de l'université de Rennes 1 (physique)
Travaux associés : article AI15, articles en préparation AP3 et AP4, communication C25, posters P20 et P17, séminaires S29, S28 et S24
Cette thèse était encadrée par Stéphane Pézennec du STLO et Sylvie Beaufils, professeur à l'IPR. A mon arrivée au STLO, une problématique qui animait ces chercheurs était le comportement des protéines globulaires à l'interface eau-air en termes d'interactions et de structuration, avec des

applications dans le domaine des mousses alimentaires par exemple. A mesure que je développais mes activités de recherche sur la micelle de caséine aux fortes concentrations, S. Pézennec et moi-même avons peu à peu discuté du lien potentiel entre interactions protéines-protéines aux interfaces et interactions protéine-protéines en *bulk*, cad mesurées en solution à travers la pression osmotique par exemple (partie 2.4.2). Ces discussions se sont concrétisées par le co-encadrement d'une stagiaire en 2010 (Sophie Rigault) sur un projet visant à mesurer la pression osmotique de solutions de protéines dont le comportement à l'interface eau-air était étudié par ailleurs. La thèse de Coralie reposait directement sur ce travail, avec un programme comprenant des mesures de pression osmotique plus exhaustives et une caractérisation de la structure des solutions concentrées et des interfaces par diffusion de rayonnement et réflectivité. Sans être fortement impliqué dans l'encadrement de Coralie, j'ai suivi son travail tout au long de sa thèse et y ai participé de façon très régulière. Mon soutien a été d'ordre expérimental avec le suivi des expériences de stress osmotique, la co-rédaction d'un *proposal* SAXS et la participation aux expériences de SAXS et réflectivité de neutron réalisées lors de la thèse. J'ai également participé de façon significative à l'analyse, l'interprétation des résultats et à la rédaction du premier article issu de ces travaux (AI15). Deux autres publications auxquelles je suis associé sont actuellement en cours de rédaction.

Anne Jimenez-Lopez, 2004-2007
Structuration du dépôt de matière à la membrane lors de la microfiltration tangentielle (0,1 µm) de lait écrémé
Thèse de doctorat de l'AGROCAMPUS-OUEST
Travaux associés : article AI6 et AN2, communication C14 et C13, poster P7
Cette thèse, dirigée par Geneviève Gésan-Guiziou, a démarré un peu plus d'un an avant mon arrivée au STLO. Le travail consistait à déterminer les principaux paramètres responsables des phénomènes de colmatage lors de la microfiltration d'un lait. L'approche suivie relevait du génie chimique classique et reposait sur des expériences de filtration réalisées sur les installations pilote du laboratoire. Je n'ai pas été associé à cette thèse de prime abord et je n'ai pas participé à l'encadrement d'Anne. J'ai par contre été associé à la réflexion autour des derniers résultats de la thèse concernant l'effet de la force ionique sur les performances de la filtration. Il s'avérait en effet que les phénomènes que j'avais mis en évidence sur des dispersions concentrées de micelles de caséines pouvaient aider à comprendre les résultats d'Anne. J'ai de ce fait participé activement à la rédaction de l'article présentant ces effets de force ionique (AI6).

Supervision de séjours postdoctoraux

Paulo De Sa Peixoto, juin 2011 - juin 2013
Diffusion de traceurs moléculaires dans des dispersions concentrées de micelles de caséine
Financement : INRA/CEPIA et BBA
Responsabilité : co-supervision avec G. Gésan-Guiziou (STLO)
Travaux associés : articles AI16 et AI14, communication C21, poster P19, séminaire S23
Ce projet visait à prolonger mes activités au STLO concernant les dispersions denses de micelles de caséine. Il s'agissait de caractériser les propriétés diffusionnelles de ces systèmes, par FRAP notamment, en vue de mieux comprendre les mécanismes de sélectivité observés en filtration. Au cours de son passage au STLO, Paulo a également pris l'initiative de réaliser des expériences de RMN

du solide sur des dispersions denses de micelles de caséine. L'objectif était cette fois de caractériser les interactions entre phosphate de calcium et caséines au sein de la micelle dans des conditions de fort confinement spatial. En raison de mon départ pour Toulouse, je n'ai côtoyé Paulo que les premiers mois de son postdoc à Rennes. Je me suis par contre pleinement impliqué dans le suivi des travaux de ce jeune chercheur par des déplacements réguliers au STLO, des visioconférences, et un suivi assidu par mails. Après ce postdoc, Paulo a continué de travailler au STLO avec différents collègues (Said Bouhallab et Fanny Guyomarc'h). Admis au concours CR2 INRA de l'année 2015, il travaille actuellement au laboratoire UMET de Lille sur des problématiques d'adhésion et de structuration de dépôts protéines-minéraux dans les installations agroalimentaires.

Encadrement de stages Master et ingénieur

Thomas Cummings, 2017 (5 semaines)
Synthèse et dégradation enzymatique de colloïdes lignocellulosiques
Stage de Master of pharmaceutical bioprocess engineering de l'université technologique de Munich
Responsabilité : 30%, co-encadrement avec Lucie Dianteill (doctorante LISBP)

Lucie Dianteill, 2015 (6 mois)
Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose
Stage de Master 2 professionnel bioingénierie biotechnologies végétales, UPS
Responsabilité : 100%
Après ce stage, Lucie a été embauchée sur les fonds propres de l'équipe TIM pour continuer ses travaux sur une période de 10 mois. Elle est actuellement en thèse sous ma codirection (cf plus-haut).

Amal Zeidi, 2014 (5 mois)
Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose
Stage de 5ème année de l'Institut national des sciences appliquées et de technologie de Tunis
Responsabilité : 100%
Travaux associés : poster P21

Florian Lange, 2012 (4 mois)
Filtration sur micro-séparateurs de particules poreuses et déformables
Stage de 1ère année d'école d'ingénieur ENSIC (alternance)
Responsabilité : 70%, co-encadrement avec M. Meireles (LGC)
Travaux associés : communication C26, séminaire S26

Wenjiao Shao, 2011 (6 mois)
Caractérisation des forces cohésives mises en jeu entre micelles de caséines en milieu concentré
Stage de Master 2 professionnel alimentation, lait, innovation, management, AGROCAMPUS-OUEST
Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO) et P. Qu (doctorant STLO)

Mustapha Ouanezar, 2011 (6 mois)
Etude de la micelle de caséine par microscopie à force atomique

Stage de Master biotechnologies, agro-alimentaire, nutrition, Université Henri Poincaré, Nancy
Responsabilité : 50%, co-encadrement avec F. Guyomarc'h (STLO)
Travaux associés : article AI8, communication C18, posters P16 et P14

Sophie Rigault, 2010-2011 (6 mois)
Compression osmotique de protéines globulaires
Stage assistant ingénieur de l'Université de technologie de Compiègne
Responsabilité : 30%, co-encadrement avec S. Pézennec (STLO)
Travaux associés : article AI15, article en préparation AP4, communication C25 et C17, poster P17

Diane Schorr, 2010 (10 mois)
Etude de la diffusion de l'eau dans les gels laitiers par la technique de RMN
Stage de Master 2 professionnel de chimie, Université de Nantes
Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO) et F. Mariette (IRSTEA Rennes)
Travaux associés : article AI10, communication C15, poster P12

Quingquing Wang, 2009-2010 (6 mois)
Etablissement de l'équation d'état de dispersions de micelles de caséine
Stage assistant ingénieur de l'Université de technologie de Compiègne
Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO) et P. Qu (doctorant STLO)

Peng Qu, 2009 (6 mois)
Filtration membranaire de dispersions modèles de micelles de caséine : relation entre pression osmotique et performance de filtration
Stage de Master 2 professionnel de sciences et technologie des aliments, AGROCAMPUS-OUEST
Responsabilité : 70%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO)

Awa Daffé, 2009 (6 mois)
Etude de la microstructure des dispersions denses de micelles de caséines : mesures de diffusion par RMN
Stage de Master 2 professionnel de chimie, Université de Nantes
Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO) et F. Mariette (IRSTEA Rennes)
Travaux associés : article AI10

Belkacem Debbou, 2008 (6 mois)
Comportement rhéologique de dispersions denses de micelles de caséine natives
Stage de Master 2 recherche de biologie, Université de Rennes 1 / AGROCAMPUS-OUEST
Responsabilité : 100%
Travaux associés : article AI4, communication C12, posters P11 et P10, séminaires S11 et S10

Pierre-Emerson Cayemitte, 2008 (6 mois)
Détermination des forces d'interactions entre micelles de caséine en solutions concentrées : mesures par compression osmotique
Stage de Master 2 professionnel de sciences et technologie des aliments, AGROCAMPUS-OUEST
Responsabilité : 100%

Travaux associés : article AI3, communication C10, posters P11 et P9, séminaires S11, S10 et S8

Sylvain Cloteau, 2007 (3 mois)
La micelle de caséine : caractérisation par AFM
Stage technique de l'IUT de Nantes
Responsabilité : 50%, co-encadrement avec E. Balnois (Université de Bretagne Sud, Lorient)
Ces travaux ont été menés pour l'essentiel au laboratoire L2PIC de Lorient (Laboratoire polymères, propriétés aux interfaces et composites), aujourd'hui partie prenante de l'Institut de recherche Dupuy de Lôme.

Abderrahim Haroun, 2006 (6 mois)
Caractérisation de dépôts obtenus en filtration frontale d'un lait écrémé
Stage de Master 2 recherche de biologie, Université de Rennes 1 / AGROCAMPUS-OUEST
Responsabilité : 50%, co-encadrement avec G. Gésan-Guiziou (STLO)
Travaux associés : communication C9

1.4 Implication dans des programmes de recherche financés

Je ne reviens pas ici sur les projets de thèses et de postdoc que j'ai codirigés ou que je codirige actuellement (cf partie 1.3,) et qui ont été financés en grande partie via des appels d'offres INRA et/ou INRA-Région.

Programme de l'ANR : projet ECOPROM 2007-2010

Le projet ECOPROM (écoconception de procédés à membranes visant l'obtention de protéines à fonction(s)), porté par Geneviève Gésan-Guiziou du STLO, a été financé de 2007-2010. Il avait pour objectif principal d'étudier les performances des opérations membranaires pour la production de fractions protéiques purifiées d'α-lactalbumine et β-lactoglobuline à partir d'un lait. Un aspect essentiel du projet était également d'adopter une démarche d'écoconception pour, à partir des résultats de la recherche, proposer des procédés plus respectueux de l'environnement. J'ai participé à la rédaction de certaines parties de ce projet avant sa soumission à l'ANR. Après son acceptation, il était ensuite prévu que je participe au développement de modèles de filtration spécifiques des protéines étudiées, en collaboration avec une doctorante du STLO (Marieke Van Audenhaege) et des chercheurs de l'université de Rennes (dont Murielle Rabiller-Baudry). Mais je n'ai finalement pas été impliqué dans ces travaux. Accessoirement, j'ai été le responsable du site internet du projet de 2007 à 2010 et conférencier invité lors d'une journée organisée dans le cadre d'ECOPROM (séminaire S10).

Financements INRA : actions nouvelles soutenues

Outre les thèses de Peng Qu et Lucie Dianteill et le postdoc de Paulo De Sa Peixoto, mes travaux ont bénéficié d'un soutien financier de l'INRA à travers le programme d'actions nouvelles soutenues (ANS) du département CEPIA. Ce programme vise à accompagner des projets nouveaux et/ou considérés comme risqués par les financeurs habituels. J'ai participé à 4 ANS, 3 en tant que porteur principal et une en tant que co-responsable :

- 2007-2008 : Evaluation des forces d'interactions intermicellaires par compression osmotique. En tant que porteur principal. Financement INRA de 2 x 7500€.
- 2009-2010 : Etude de la microstructure de dispersions concentrées et de gels de micelles de caséines : mesures de diffusion par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). En tant que participant actif (G. Gésan-Guiziou était le porteur principal). 2 x 15000€.
- 2010-2011 : Interactions à courte distance et phénomènes d'adhésion entre micelles de caséine : que peut-on apprendre de mesures de force ? En tant que porteur principal avec F. Guyomarc'h (STLO). 2 x 15000€.
- 2014-2015 : Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose par QCM-D. En tant que porteur principal. 2 x 15000€.

***Proposals* sur grands instruments**

Ces projets sont financés par les organismes où les expériences sont réalisées (synchrotrons, réacteur nucléaire de recherche) après un processus d'évaluation des propositions qui leur sont faites. Il s'agit de projets de petite envergure mais il me semblait quand-même intéressant de les donner ici.

- 2016, *proposal* ILL n°9-13-664 : Interactions of alpha-synuclein with lipid vesicles. Le responsable de ce projet était Bernard Cabane, en collaboration avec des collègues de l'université de Lund dont Emma Sparr notamment. 72 heures ont été allouées sur la ligne D11 pour des expériences SANS en variation de contraste.

- 2013, *proposal* LLB n°1149672 : Modalités d'adsorption de protéines globulaires à l'interface air—solution. Responsable principal : Stéphane Pézennec, STLO. 96 heures allouées sur le spectromètre HERMES pour des expériences de réflectivité de neutrons.
- 2011, *proposal* Soleil n°20110380 : Protein interactions and self-assembly in highly crowded conditions. Co-responsable avec Stéphane Pezennec, STLO. 48 heures allouées sur la ligne SWING, SAXS.
- 2010, *proposal* ILL n°9-13-342 : Structure of casein micelles. Co-responsable avec Bernard Cabane, ESPCI. 72 heures allouées sur la ligne D11, SANS.
. 2008, *proposal* Soleil n°20080305 : Understanding the phase behaviour of concentrated casein micelles suspensions: the role of inter- and intra-micellar interaction forces. Responsable principal. 24 heures allouées sur la ligne SWING, SAXS.

1.5 Animation de la recherche, responsabilités collectives

Dans les laboratoires

Depuis 2017. Séminaire du LISBP. Depuis le 1er janvier 2017, Stéphanie Heux (CR INRA) et moi-même sommes responsables de l'organisation des séminaires internes du LISBP. Ces séminaires existent depuis 2015, la direction souhaitant alors relancer une animation scientifique large et ouverte à l'ensemble du laboratoire. Les séminaires ont lieu une semaine sur deux le jeudi en début d'après-midi et sont donc ouverts à tous les personnels du LISBP, soit environ 320 personnes. Proposer des séminaires réguliers à un collectif aussi important n'est pas une tâche facile, d'autant que le LISBP est un laboratoire multidisciplinaire qui rassemble des personnes d'horizons variés et très spécialisés : du métabolisme des cellules eucaryotes à la mécanique des fluides par exemple. Sur la période 2015-2016, la fréquentation des séminaires a d'ailleurs très nettement baissé, avec une ségrégation progressive des publics en fonction des intérêts de chacun. Pour 2017, notre objectif avec Stéphanie Heux est de mobiliser à nouveau l'ensemble du laboratoire autour de ces séminaires. Pour ce faire, notre idée est d'alterner séminaire d'équipe et séminaire d'un intervenant extérieur. Les séminaires d'équipe sont l'occasion d'informer l'ensemble du laboratoire des travaux de chacun, du démarrage d'un projet important, ou de l'existence d'une technique expérimentale ou de simulation susceptible d'intéresser le plus grand nombre, par exemple. Les séminaires extérieurs sont eux donnés par des intervenants chercheurs ou industriels extérieurs au LISBP (national, international). Là, tous les sujets en lien avec les thématiques du laboratoire peuvent être abordés et nous proposons de ne pas nous limiter aux approches de sciences *exactes*, mais aussi pourquoi pas de nous ouvrir aux sciences humaines : éthique, sociologie, philosophie, histoire, économie. Dans tous les cas, nous demandons aux intervenants de faire un effort particulier pour que leur présentation soit simple et accessible. Depuis sa mise en place, cette nouvelle formule n'a pas vraiment permis de regagner autant de public que nous le souhaitions, mais il est certainement encore un peu tôt pour juger de sa réelle pertinence.

Depuis 2015. Club lignocellulose au LISBP. Les activités de recherche concernant la dégradation et la valorisation de la biomasse lignocellulosique sont nombreuses au LISBP. La thématique est de plus clairement transverse et inter-équipes, avec des approches variées relevant de la microbiologie, de l'ingénierie enzymatique, du génie des procédés, et des technologies *omiques* pour la découverte de nouvelles enzymes. En février 2015, Cédric Montanier (CR INRA), Guillermina Hernandez-Raquet (DR INRA), et moi-même avons pris l'initiative de créer un *club lignocellulose*. L'objectif était de disposer au LISBP d'une structure pérenne visant à promouvoir les échanges et discussions entre les chercheurs impliqués dans une problématique relevant de la lignocellulose. Les objectifs du club sont divers : lieu d'échanges et de convivialité, émulation/stimulation scientifique, outil d'analyse des forces et faiblesses du laboratoire sur le thème, moyen d'accroitre la visibilité du groupe en interne et à l'extérieur, préparation de documents communs d'information et de communication. Le club s'est réuni un peu plus d'une dizaine de fois depuis 2015. A ses débuts, il rassemblait un nombre important de scientifiques du laboratoire. Les premières réunions ont permis à chacun de présenter ses recherches et de dresser ainsi une cartographie complète des activités lignocellulose au LISBP. Les réunions suivantes, généralement organisées autour d'une présentation d'un doctorant ou postdoctorant autour de questions plus spécifiques, ont eu moins de succès. Mais là encore, une

telle animation relève d'un travail de longue haleine et nous continuons de faire vivre le club en tentant d'assurer des réunions régulières et qui intéressent le plus grand nombre.

2009-2011. Responsable de la microscopie à force atomique au STLO. Courant 2009, la direction du STLO m'a demandé de m'occuper de l'achat d'un AFM pour le laboratoire : montage des dossiers de subvention, appel d'offre, arbitrage. L'AFM retenu, d'une valeur d'environ 220 k€, a été réceptionné en novembre 2009. Il s'agissait alors d'un instrument de dernière génération, spécialement conçu pour la manipulation d'objets biologiques, couplé avec un microscope optique inversé et offrant la possibilité de travailler en milieu liquide. J'ai été le responsable principal de cet appareil de novembre 2009 jusqu'à mon départ à Toulouse en octobre 2011. J'ai demandé à Gwenaël Jan (DR INRA) et Fanny Guyomarc'h (IR INRA) de me seconder dans cette tâche sur les applications microbiologie et biochimie, respectivement. Dans un premier temps, mon rôle a consisté à faire connaître la technique AFM de mes collègues du STLO afin de susciter leur intérêt et d'engager différentes actions de recherches : de l'obtention rapide d'images d'appoint à l'élaboration de projets centrés sur l'utilisation de l'AFM. Au cours de cette période, F. Guyomarc'h et moi-même avons réalisé différents travaux concernant la micelle de caséine (stage Mustapha Ouanezar, article AI8) et les propriétés de surface de bactéries probiotiques (article AI7). A mon départ de Rennes, Fanny Guyomarc'h est devenue la responsable principale de l'appareillage AFM au STLO. La technique est à présent utilisée de façon régulière par les chercheurs du STLO.

Au niveau local et régional

Depuis 2011. Fédération de recherche FERMaT. La fédération de recherche FERMaT (fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts, fédération CNRS n°3089) est une entité toulousaine structurée autour de 6 laboratoires principaux : le LGC, l'IMFT, le CIRIMAT, le LAPLACE, le LAAS et le LISBP. La fédération a pour objectif central d'initier et de soutenir des projets de recherche interdisciplinaires dans le domaine des sciences pour l'ingénieur sur Toulouse et sa région. Ce soutien se concrétise par l'achat d'équipements lourds mis à disposition des laboratoires FERMaT et de leurs partenaires universitaires ou industriels. FERMaT finance également un contrat postdoctoral chaque année sur des projets inter-laboratoires. FERMaT est organisé autour de 5 thèmes de recherche auxquels peuvent participer les chercheurs de tous les laboratoires impliqués. Des réunions de thème sont organisées régulièrement (1-2 par an) pour confronter les idées et approches de chacun et discuter des projets communs en cours et à venir. Depuis 2011, je participe à deux thèmes de recherche : (1) Milieux poreux et colloïdes, dans lequel apparait la thèse d'I. Bouhid de Aguiar, codirigée avec Martine Meireles du LGC, (2) Ingénierie du vivant, dans le cadre de mes recherches sur la biomasse lignocellulosique mais sans véritable projet labellisé FERMaT pour l'instant. Je suis également responsable du thème milieux poreux et colloïdes depuis janvier 2017. Cette responsabilité consiste à animer le thème par des réunions régulières (au moins deux par an) généralement construites autour de l'intervention d'un chercheur sur une problématique particuliére. Les réunions de thème sont aussi l'occasion pour les membres de faire remonter et de discuter leurs demandes d'instrumentation et de financement de postdoc. Le responsable de thème a en charge de classer ces demandes et de les proposer au conseil de la fédération qui se regroupe également deux fois par an. L'arbitrage final est réalisé au cours de ce conseil qui rassemble les responsables de thème et les représentants de chaque laboratoire. Dans le cadre du CPER 2015-

2020, la fédération FERMaT a obtenu une somme d'argent qui a permis l'acquisition d'un instrument SAXS installé sur le campus de l'UPS fin 2016. L'accès à cet instrument se fait après soumission et acceptation d'une proposition d'expériences. En tant que responsable de thème, je suis amené à participer à l'examen de ces propositions.

Au niveau national

Depuis 2006. GdR AMC2, approches multi-physiques pour les systèmes colloïdaux concentrés. Ce GDR, initialement intitulé "Structuration, consolidation et drainage de colloïdes" existe depuis 2006 et a été renouvelé pour 4 ans en 2010 puis 2014. Il est dirigé par Martine Meireles (LGC, Toulouse) et regroupe, dans sa configuration actuelle, des chercheurs de près de 20 laboratoires différents dont 4 laboratoires INRA. L'objectif du GDR est de promouvoir les échanges et les collaborations autour des questions relatives au comportement des objets colloïdaux (protéines, polymères, particules) et à leurs interactions dans les processus de concentration (compression, séchage, filtration) ou de redispersion. Ces échanges ont lieu lors d'un séminaire annuel organisé sur 2 jours et auquel est adossé certaines années un workshop ouvert à l'international sur une question en particulier (nanocomposites polymères, processus de séchage par ex.). Je suis membre de ce GDR depuis 2008, et conférencier/co-conférencier lors des séminaires organisés depuis cette date (séminaires S31, S29, S28, S27, S26, S25, S24, S23, S20, S19, S18, S17, S11, S9 et S8 en annexe B). La plupart des travaux présentés relèvent de mes activités au STLO et du comportement de la micelle de caséine ou des protéines globulaires aux fortes concentrations. Mais les approches de physico-chimie que je développe au LISBP pour suivre l'action d'enzymes lignocellulolytiques ont également toute leur place et cohérence dans ce GDR. C'est la raison pour laquelle je continue d'y être pleinement engagé.

Depuis 2017. Projet de GdR SLAMM, structurer la matière molle. Le GdR AMC2 arrive à son terme fin 2017. Cependant, les équipes impliquées ont clairement l'intention de continuer à travailler ensemble et de renouveler l'expérience d'un GdR sur la période 2018-2021. Je suis directement impliqué dans cette initiative car je suis le coordinateur INRA du projet de GdR SLAMM porté côté CNRS par Laurence Ramos (L2C, Montpellier) et Ludovic Pauchard (FAST, Orsay). Mes collègues et moi-même sommes en train de préparer le dossier de création de ce GdR pour une soumission à l'institut de chimie du CNRS à l'été 2017. Le département CEPIA de l'INRA a d'ores et déjà donné son accord pour un soutien financier de l'ordre de 7500€ par an si le GdR est accepté par le CNRS. Avec le projet SLAMM, l'objectif est de fédérer des chercheurs autour de l'approche scientifique déjà revendiquée dans le GdR AMC2 et qui consiste (i) à caractériser, aux échelles intermédiaires (du nanomètre au micron), les structures et interactions au sein d'un système d'intérêt, (ii) à établir les liens entre ces propriétés et le comportement du système à l'équilibre ou au cours d'un processus de transformation. Notre idée est de couvrir une plus grande étendue de thématiques et d'objets d'étude que le GdR AMC2. Il s'agit notamment de ne plus limiter le GdR aux systèmes colloïdaux concentrés mais de l'élargir aux systèmes colloïdaux en général, incluant les solutions de polymères et les protéines, et aux problématiques rencontrées aux interfaces, dans les émulsions et dans des gels. L'objectif est également d'accorder une part encore plus importante aux activités de l'INRA, avec une ouverture vers les problématiques de dégradation enzymatique et de diffusion et transport de petites espèces dans des structures diverses : matrices fromagères et paroi lignocellulosique par exemple. Les actions que nous prévoyons sont proches de celles déjà mises en place dans AMC2,

avec un séminaire annuel et l'organisation connexe de workshops ou écoles chercheur.

Contributions diverses

- Je suis rapporteur pour des revues internationales dont Journal of Membrane Science, Separation & Purification Technology, Langmuir, Food Hydrocolloids, Pharmaceutical Research, Soft Matter, International Dairy Journal.
- J'ai participé à la rédaction d'un certain nombre de documents INRA (pages web, rapport, plaquettes) à destination du grand public et/ou d'un public plus spécialisé. Ces documents sont listés en annexe B.
- Enfin j'ai participé et je participe encore à un total de six comités de thèse, dont actuellement les thèses de Haiyang Wu, dirigée par Claire Dumon (LISBP), Louise Badruna, dirigée par Cédric Montanier (LISBP), et Floriane Doudiès, dirigée par Geneviève Gésan-Guiziou (STLO).

2 Activités de recherche

Procédés de filtration, micelle de caséine... et matière molle

2.1 Mécanismes de sélectivité de membranes synthétiques et biologiques

Nanofiltration de solutions d'acides organiques et de sucres
Articles AI1 et AI2

Les travaux évoqués ici sont mes travaux de thèse, effectuée au LGC de Toulouse sous la direction d'Hélène Roux-de Balmann au sein du département GIMD du LGC. Ils sont une contribution aux recherches du LGC dans le domaine des procédés de filtration membranaire, axe historiquement fort de ce laboratoire. Ils s'inscrivaient à l'époque dans la cadre d'un partenariat entre le LGC et l'entreprise Eurodia, principal fournisseur européen d'équipement d'électrodialyse. J'ai bénéficié d'une bourse de docteur ingénieur (BDI) cofinancée par Eurodia et le CNRS pour réaliser ces travaux.

Le contexte général de ces recherches était l'amélioration des procédés de production d'acides organiques. Les acides organiques (lactique, citrique, gluconique) sont utilisés dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires et représentent un marché en continuelle expansion. Ces composés sont principalement produits par fermentation. Après clarification, le jus de fermentation contient l'acide sous une forme dissociée (e.g. sel de sodium) et des impuretés résiduelles dont des sucres et des sels minéraux. Il s'agit par la suite de convertir l'acide sous sa forme non dissociée et d'éliminer les impuretés pour obtenir un produit aux propriétés d'usage voulues. Traditionnellement, l'étape de conversion du sel d'acide en son acide conjugué était opérée par précipitation. Mais la précipitation a pour inconvénient majeur d'utiliser de grandes quantités d'acide et de générer des volumes importants d'effluents minéraux non valorisables. Les contraintes environnementales ont donc poussé au développement de techniques plus propres de conversion du sel d'acide. Parmi celles-ci, l'électrodialyse à membranes bipolaires (EDMB) permet de convertir le sel d'acide sans ajout ni création d'un produit tiers par migration sélective des espèces à travers des membranes échangeuses d'ions.[1] Des étapes de purification n'en restent pas moins nécessaires pour compléter le procédé : avant conversion pour éliminer les cations divalents présents dans les jus et qui affectent la durée de vie des membranes d'EDMB, après conversion pour éliminer le glucose des jus convertis.

A mon arrivée au LGC, les procédés de production d'acides organiques fondés sur une étape d'EDMB étaient en plein développement. L'entreprise Eurodia proposait déjà des installations à la vente, mais cherchait à améliorer le procédé et à en diminuer les coûts d'opération. Une voie d'amélioration consistait à optimiser les étapes de purification avant et après EDMB. Des travaux antérieurs au LGC avaient notamment suggéré que la nanofiltration pouvait être utilisée pour ces étapes à la place de techniques plus couteuses et plus difficiles à mettre en œuvre comme les résines échangeuses d'ions par exemple. L'objectif de ma thèse était d'évaluer cette proposition.

La nanofiltration est une opération de filtration membranaire qui permet de séparer des molécules présentes en solution aqueuse sous l'effet d'un gradient de pression hydrostatique. Les membranes de nanofiltration sont poreuses avec des diamètres de pores de l'ordre du nanomètre. Elles sont également chargées avec des charges fixes qui varient selon le pH et le matériau membranaire. Les

mécanismes de sélectivité de la nanofiltration sont régis à la fois par des effets de taille et de charge. Les molécules neutres sont retenues par des effets de taille uniquement, avec des rétentions totales pour les molécules de taille supérieure à 1-2 nm environ. A taille identique, les composés chargés sont quant à eux d'autant plus retenus que leur charge est élevée (e.g. mono- contre divalent) et de même signe que la charge de la membrane.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé principalement à la production d'acide lactique à partir d'un jus de fermentation de lactate de sodium. Dans ce cas, la nanofiltration était a priori utilisable à la fois en amont et en aval de la conversion par EDMB. L'idée était à chaque fois de retenir les impuretés de type ions divalents et glucose et de laisser passer le lactate de sodium ou l'acide lactique, plus petit et/ou moins chargé, à travers la membrane. Le travail expérimental a consisté à évaluer chacune de ces possibilités en utilisant une membrane de nanofiltration aux caractéristiques connues et une installation pilote de petite envergure (membrane de ~150 cm^2). Afin de comprendre au mieux les phénomènes de sélectivité, notre choix a été d'utiliser des solutions modèles ne comportant qu'un ou deux composé(s) à des concentrations qui correspondent à celles de jus de fermentation : eau + acide lactique, eau + lactate de sodium, eau + glucose, mélanges. Des expériences sur des jus de fermentation réels de composition beaucoup plus complexe que ces solutions simples ont été réalisées en fin de thèse.

Un résultat majeur de ce travail est d'avoir mis en évidence des phénomènes inédits d'interactions entre solutés neutres et chargés en nanofiltration. Ceci est illustré sur la Fig.1 ci-dessous.

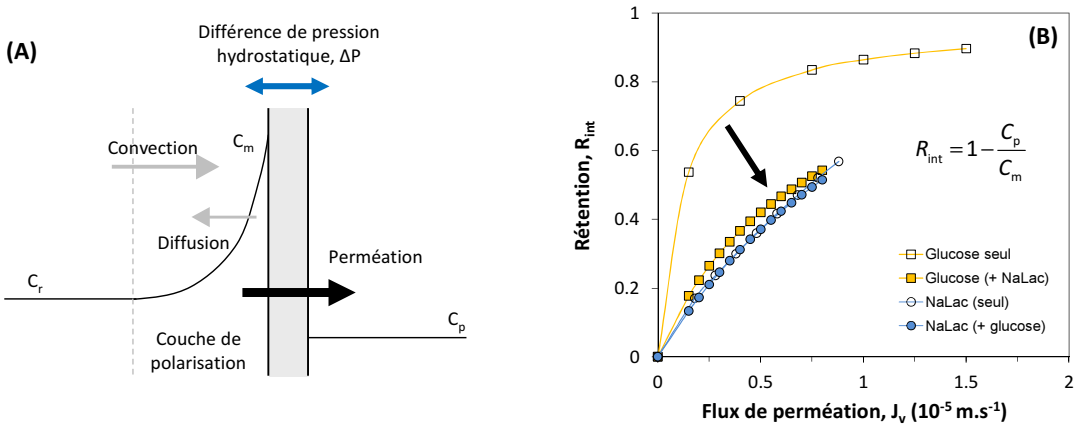

Fig.1. (A) Principe d'une filtration sur membrane, (B) Sélectivité d'une membrane de nanofiltration vis à vis de solutions contenant 0.1 M de glucose et/ou 0.5 M de lactate de sodium.

La sélectivité d'une membrane de filtration vis à vis d'un composé se mesure via une rétention intrinsèque R_{int} définie à partir des concentrations de ce soluté de part et d'autre de la membrane, C_p et C_m (Fig.1A) : la rétention est nulle quand $C_p = C_m$, elle est totale quand C_p est nulle. Pour les composés plus petits que les pores, la rétention n'est jamais totale mais dépend du flux de perméation J_v à travers la membrane (Fig.1B). A flux nul, le composé diffuse librement à travers la membrane et il n'y a pas de rétention. A mesure que le flux de perméation augmente, la rétention

augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau qui dépend des caractéristiques du soluté et de la membrane.

La sélectivité de la nanofiltration vis à vis du glucose et du lactate de sodium est donnée sur la Fig.1(B). Comme attendu, en solution simple d'un unique composé (symboles vides), la rétention du glucose est toujours supérieure à celle du lactate de sodium en raison de la différence de taille entre les deux solutés : 7 Å pour le glucose, 4.6 Å pour le lactate. Le résultat est beaucoup plus surprenant lorsque les deux composés sont présents ensemble en solution (symboles pleins). Dans ce cas en effet, la rétention du glucose chute de moitié par rapport à ce qui est mesuré en solution simple. A l'inverse, la rétention du lactate de sodium n'est pas affectée par la présence de glucose. Cette chute de rétention du glucose est un phénomène complètement inattendu qui, au moment de sa découverte, n'avait jamais été reporté en filtration membranaire. De plus, cet effet n'existe pas dans les mélanges acide lactique / glucose, et c'est donc la nature *chargée* du lactate de sodium qui modifie la rétention du glucose. Nous avons de plus retrouvé un effet de ce type sur des mélanges NaCl / glucose, indiquant qu'il s'agit là probablement d'un effet générique d'interactions neutre-chargé en nanofiltration.

En tant qu'espèce non chargée, le glucose n'est retenu que par des effets de taille en nanofiltration. Dès lors, la diminution de sa rétention peut s'expliquer par (i) une augmentation de la taille moyenne des pores de la membrane, (ii) une diminution de la taille apparente du glucose, (iii) une combinaison des deux phénomènes. L'hypothèse la plus probable est celle de la diminution de la taille apparente du glucose en présence de sel; la taille apparente étant la taille de l'objet *glucose* et du cortège de molécules d'eau qui l'entourent. La présence de sel viendrait déstabiliser et/ou amenuiser cette couche d'hydratation. La molécule de glucose devient alors plus petite du point de vue de la nanofiltration et son passage est facilité. Nous avons proposé que ce phénomène était certainement à rapprocher des effets de *salting-out* mis en évidence par Hofmeister en 1888 et qui dépendent de la nature et de la concentration des ions mis en jeu.[2]

A mon sens, ces résultats constituent une avancée importante dans l'identification des mécanismes de rétention en nanofiltration. Nous les avons publiés en 2005 dans *Journal of membrane science* (article AI1). La même année, une équipe néerlandaise publiait dans le même journal une étude aux résultats très proches des nôtres sur des mélanges glucose/NaCl.[3] Ces deux articles sont à ma connaissance les premiers à rapporter de tels effets d'interaction neutre-chargé en filtration. Ils ont depuis été suivis de nombreuses études visant à comprendre ces effets et à (in-)valider les hypothèses permettant de les décrire.[4–6] A l'heure actuelle, ces phénomènes sont toujours en cours d'investigation. Au LGC, l'équipe d'Hélène Roux de Balmann travaille d'ailleurs toujours en partie à leur élucidation.[7–9]

Du point de vue applicatif, les résultats d'expériences de nanofiltration sur jus de fermentation réels ont permis de répondre plus directement à la question de l'intégration de cette opération dans les procédés de production d'acides organiques. En particulier, nous avons montré que la nanofiltration retient de manière satisfaisante l'ensemble des sels divalents présents dans les jus de fermentation de lactate de sodium (article AI2). Ceci permet de réaliser la conversion par EDMB à de faibles taux d'ions divalents et de préserver ainsi l'intégrité des membranes échangeuses d'ions. A l'heure actuelle, je n'ai pas d'informations précises sur l'utilisation de la nanofiltration dans les procédés

qu'Eurodia conçoit et propose à la vente. Toujours est-il que l'entreprise revendique à présent une activité *nanofiltration* et que mes travaux de thèse ont certainement contribué à son émergence.

Nuclear pore complex et microscopie à force atomique

A la suite de ma thèse, j'ai accepté une proposition de postdoc dans l'équipe de Georges Belfort aux Etats-Unis (RPI, NY). Les travaux de Georges Belfort sont connus et respectés dans le domaine de la filtration membranaire, en particulier en ce qui concerne la sélectivité des opérations d'ultra- et de microfiltration.[10] Mais c'est un sujet relativement différent qui m'a occupé durant mon séjour au RPI puisqu'il s'agissait d'étudier la sélectivité d'une membrane *biologique* et non synthétique. Ces travaux s'inscrivaient à l'époque dans le cadre d'un projet d'envergure (bourse *Nanograant* des *National institutes of health*) déposé par la *Rockefeller university* de New York en collaboration avec l'université de Münster en Allemagne et le RPI.

Le projet avait pour objet d'étude le *nuclear pore complex* (NPC), assemblage complexe de protéines qui constitue les pores des membranes nucléaires des cellules biologiques eucaryotes.[11] Les NPC sont les principaux médiateurs de transport de protéines entre cytoplasme et noyau cellulaire. Ces petites machines protéiques possèdent une sélectivité étonnante dont les mécanismes étaient et sont encore très mal connus.[12] Une des hypothèses couramment avancées repose sur l'existence d'interactions moléculaires spécifiques entre des protéines-filaments (intrinsèquement désordonnées) émanant du pore central du NPC (les FG nucléoporines ou FG-Nups, Fig.2A) et des protéines chaperonnes présentes en solutions dans le cytoplasme et le noyau (les karyophérines ou Kaps). Les protéines qui traversent le NPC librement sont celles qui comportent une séquence particulière leur permettant de s'associer à une protéine chaperonne. Le complexe ainsi formé est reconnu par le NPC grâce aux interactions spécifiques entre Kaps et FG-Nups, et peut donc être transporté le long du pore central.

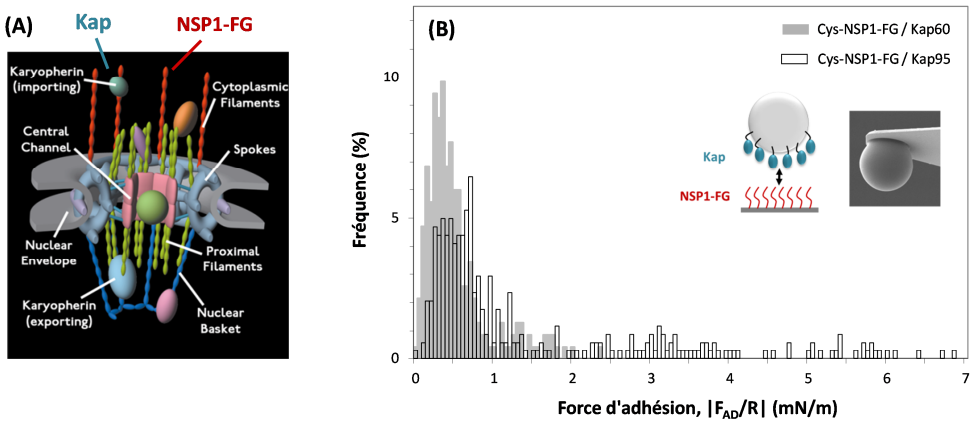

Fig.2. (A) Le *nuclear pore complex*, (B) Mesures par AFM de forces d'adhésion entre protéines constitutives du NPC et protéines chaperonnes.

Mon travail a consisté à vérifier l'existence d'interactions spécifiques entre FG-Nups et Kaps par microscopie à force atomique. L'AFM permet en effet de mesurer des forces de l'ordre du piconewton entre des entités microscopiques comme des protéines. Il est pour cela nécessaire d'immobiliser une des protéines d'intérêt sur une surface, tandis que l'autre protéine est immobilisée sur une bille d'environ 10 µm elle-même collée au bout d'une pointe AFM (insert Fig.2B). Selon l'approximation de Derjaguin, et moyennant une normalisation par le rayon R de la bille, la force mesurée entre bille et surface est alors assimilable à l'énergie d'interaction entre deux plans.[13] Dans le cas qui nous intéresse, le principe de la mesure AFM est d'amener la bille au contact de la surface, de la laisser y adhérer pendant un temps donné, et de la retirer jusqu'à détachement. La force d'adhésion F_{AD} est la force maximale enregistrée par l'AFM au moment du détachement.

La Fig.2B donne les résultats de mesures réalisées entre FG-Nups et des karyophérines ayant des affinités différentes pour les nucléoporines : Kap95, forte affinité, et Kap60, faible affinité. Les Kaps sont immobilisés sur les billes via leurs résidus lysine en utilisant une chimie classique de greffage de type EDC/NHS. Les FG-Nups sont quant à eux modifiés en bout de chaine par l'ajout d'un résidu cystéine qui a une grande affinité pour l'or. Ils sont immobilisés sur des surfaces recouvertes d'une fine couche d'or de façon à former une *brosse* de protéines similaire à ce que l'on retrouve à l'entrée du NPC. Les énergies d'adhésion mesurées entre FG-Nups et Kap60 sont pour la plupart comprises entre 0 et 2 mN/m et sont plus probablement le fait d'interactions non-spécifiques entre ces deux entités. A l'inverse, la moitié des évènements d'adhésion entre FG-Nups et Kap95 mettent en œuvre des énergies plus grandes comprises entre 2 et 7 mN/m, ce qui signerait l'existence d'interactions spécifiques.

Mon séjour aux Etats-Unis n'a duré que neuf mois, et je n'ai pas pu finaliser complètement ces expériences et élargir les mesures à des systèmes moins connus et peut-être plus intéressants. Aussi ces mesures par AFM n'ont pas été reprises pas un étudiant ou postdoctorant à mon départ. Il n'y a donc pas eu de valorisation de ces résultats hormis deux posters et une présentation dans un congrès. Mais je tenais à les présenter brièvement dans ce document car cette expérience postdoctorale m'a permis d'aborder des techniques et concepts que j'ai continué d'utiliser par la suite dans mon parcours de chercheur.

2.2 Comprendre et modéliser la filtration du lait

Les activités de recherche que je présente dans cette partie concernent directement la thématique qui m'a été confiée à mon recrutement au laboratoire STLO de Rennes en janvier 2006; à savoir la filtration du lait, sa compréhension, et sa modélisation. Ces recherches ont donné lieu à une dizaine d'articles, ce qui constitue un part importante de mon travail de chercheur jusqu'à présent. Suite à mon départ sur Toulouse et mon affiliation au LISBP, je ne travaille dorénavant plus sur cette thématique.

L'UMR STLO est née en janvier 2004 de la fusion du laboratoire de recherche en technologie laitière et du laboratoire de technologie des ovoproduits. Le STLO regroupe aujourd'hui environ 70 permanents, et relève de deux départements INRA de tutelle: Microbiologie et Chaîne Alimentaire (MICA, ~1/3 des effectifs) et Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA, ~2/3 des effectifs). Les activités de l'UMR s'articulent autour de différents thèmes liés à la connaissance et à la maîtrise de la qualité, de la fonctionnalité et de la transformation des produits issus du lait et de l'œuf. Le STLO est actuellement organisé en 5 équipes de recherche recouvrant ces thèmes : microbiologie des filières lait et œuf, physico-chimie des protéines et des lipides, bioactivité et nutrition, procédés de séparation par membrane, procédés de séchage. Il en résulte un environnement très multidisciplinaire alliant biochimie, physico-chimie des protéines, microbiologie et génie des procédés.

Sur la période 2006-2013, le STLO était structuré légèrement différemment à maintenant. Les recherches concernant les opérations de filtration et de séchage étaient menées au sein d'une même équipe intitulée *procédés pour l'industrie laitière* (acronyme TIPIL). L'objectif finalisé de ces recherches était de parvenir à maîtriser ces opérations et de contrôler la qualité des produits qui en sont issus. TIPIL était une équipe de taille moyenne regroupant alors 4 ingénieurs (IE/IR), 8 techniciens, 5 chercheurs et enseignant-chercheurs et environ 10 doctorants. Mes activités de recherche concernaient bien sûr la partie *filtration* de cette équipe. A mon arrivée au STLO, cette composante était portée par une unique scientifique, Geneviève Gésan-Guiziou, DR INRA et deux techniciennes (Nadine Leconte et Fabienne Lambrouin). A présent, les activités filtration du STLO sont rassemblées dans une équipe indépendante (PSM, *procédé de séparation par membrane*), qui a récemment accueilli un second scientifique, Maksym Loginov, CR INRA depuis septembre 2016.

2.2.1 Problématique et stratégie adoptée

Depuis sa création, l'INRA a été à la source de nombreuses innovations dans les domaines des sciences et des technologies laitières. Outre l'approfondissement de la connaissance des composants du lait et la recherche systématique de nouvelles voies de leur valorisation, une partie importante des travaux a concerné, et concerne encore, l'amélioration des procédés de transformation du lait en produits conventionnels, e.g. lait de consommation, laits fermentés, fromages. Dans ce contexte, les technologies à membrane ont très tôt été identifiées comme des opérations pouvant permettre une amélioration globale de ces procédés. Ce succès repose sur le fait que les techniques de filtration membranaire sont capables d'effectuer des séparations fines au sein de solutions complexes comme

le lait. Elles ont également pour avantages de ne pas altérer les propriétés organoleptiques des fluides traités et d'être parfaitement adaptées aux normes d'hygiène de l'industrie agroalimentaire.

Le lait est en majorité composé d'eau, de lactose, de matière grasse, de sels minéraux et de protéines (Fig.3A). Parmi ces dernières, il convient de distinguer les protéines dites *solubles* du lait (α-lactalbumine, β-lactoglobuline, immunoglobuline) des caséines, présentes sous la forme d'agrégats colloïdaux de 10^4 à 10^5 unités et environ 200 nm de diamètre appelées *micelles de caséine*. Le lait *brut* contient également inévitablement des bactéries récoltées au cours des opérations de traite et de collecte.

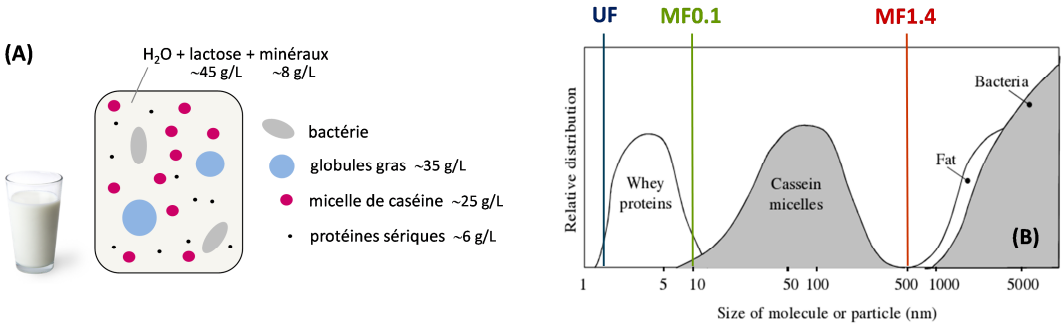

Fig.3. (A) Composition moyenne d'un lait de vache, (B) Distribution de taille des composés majoritaires du lait et seuils de coupure de l'ultrafiltration (UF) et de la microfiltration 0.1 µm (MF0.1) et 1.4 µm (MF1.4), figure adaptée de James et al.[14]

Suivant le seuil de coupure des membranes utilisées, les techniques de séparation membranaires peuvent être utilisées de différentes manières pour le traitement du lait (Fig.3B).[15] La technique la plus répandue dans l'industrie laitière est l'ultrafiltration. Elle permet de concentrer la totalité des protéines du lait (protéines solubles et micelles de caséine, retenues par la membrane), et ainsi de standardiser les laits avant transformation et de limiter les volumes manipulés en fromagerie. La microfiltration peut quant à elle, selon la taille de pore des membranes, servir à éliminer les bactéries indésirables ou pathogènes d'un lait (MF1.4) ou encore à fractionner un lait afin d'en extraire les composés voulus (séparation micelles de caséine / protéines solubles, MF0.1).

Les opérations de filtration sont dans tous les cas opérées en mode tangentiel, cad que le fluide circule de façon tangentielle à la paroi de la membrane. La filtration est réalisée à travers l'application d'une pression hydrostatique sur le fluide circulant. L'écoulement tangentiel a pour effet de limiter les effets de surconcentration à la membrane par des phénomènes de *shear-induced back-diffusion* (comme décrit par exemple dans la *review* historique de Georges Belfort sur la microfiltration...[10]). Il n'en demeure pas moins que le phénomène de polarisation de concentration persiste dans tous les cas, la rétrodiffusion des espèces retenues n'étant jamais suffisante pour contrecarrer complètement l'accumulation induite par le flux convectif vers la membrane.

Les procédés à membranes ont connu un développement extrêmement rapide dans la filière lait, si bien que leur conduite est encore hasardeuse et que de nombreuses questions scientifiques

demeurent quant aux mécanismes de transfert qu'elles impliquent. Le facteur principal limitant les performances de l'ultra- et de la microfiltration tangentielle d'un lait est la formation d'un dépôt de micelles de caséines en surface de la membrane. Ce dépôt affecte la perméabilité de la membrane et donc le rendement de l'opération. Il peut également, et c'est le cas particulièrement lors de la microfiltration d'un lait, modifier la sélectivité de la membrane envers les protéines solubles lors de la filtration (par augmentation de leur rétention). L'opération perd alors son caractère discriminatoire envers les protéines solubles et les micelles de caséine, et par conséquent son efficacité.

Comme illustré sur la figure suivante (Fig.4), l'apparition du dépôt dépend étroitement des conditions opératoires de filtration.[16] Dans le cas (A), le flux tangentiel à la paroi est suffisamment important pour limiter l'accumulation des micelles de caséine à la surface de la membrane. Il n'y a pas formation de dépôt et l'accumulation n'est pas suffisante pour gêner le transfert d'eau et, dans le cas de la microfiltration, modifier la transmission des protéines sériques. Dans le cas (B), le flux tangentiel n'est pas suffisamment important et l'accumulation est telle qu'il y a formation du dépôt de micelles de caséine à la membrane. La résistance hydraulique augmente excessivement jusqu'à diverger (= la filtration est quasi-stoppée) et la transmission des protéines chute drastiquement.

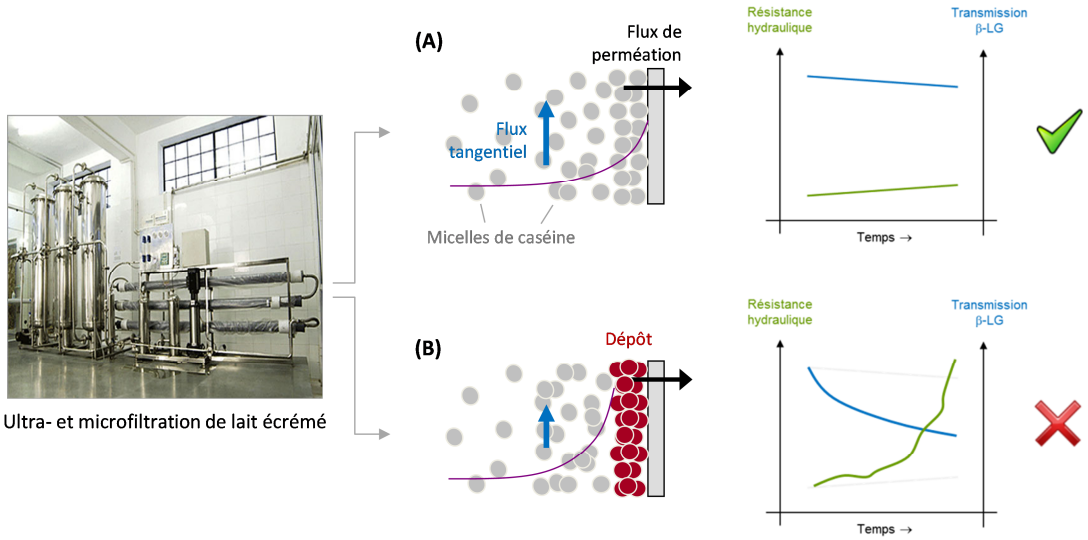

Fig.4. Représentation schématique de l'ultra- ou microfiltration tangentielle d'un lait écrémé : (A) Conditions stables, (B) Conditions instables. La résistance hydraulique est une mesure de la résistance au transfert d'eau à travers la membrane à une pression transmembranaire donnée. β-LG = β-lactoglobuline.

Afin de maitriser l'opération de filtration, la question essentielle est donc d'élucider les mécanismes responsables de l'apparition du dépôt de micelles de caséine. En 2006, cette question était abordée dans l'équipe TIPIL à travers des approches relevant essentiellement du génie des procédés *classique*. La plupart des travaux étaient menés sur des installations pilotes de filtration avec pour objectif, par exemple, de déterminer précisément les conditions d'apparition du dépôt via un suivi rigoureux des performances de filtration en termes de flux et de sélectivité.[16–18]

A mon arrivée, j'ai élaboré un projet de recherche visant à compléter ces approches par une caractérisation fine des phénomènes d'interaction, de transition de phase et de structuration dans les dépôts de micelles de caséine. Pour cela, l'approche expérimentale consistait à *sortir* du procédé, produire des dispersions de micelles de caséines à des concentrations similaires à celles retrouvées en filtration à la surface des membranes, et déployer un arsenal analytique adapté pour caractériser les propriétés qui m'intéressaient. Je proposais ainsi de répondre aux questions suivantes :

(i) Quelles interactions sont mises en jeu lorsque l'on concentre une dispersion de micelles de caséines ? Quel lien entre ces interactions et le comportement de phase des dispersions ?

(ii) Dans quelle mesure le dépôt est-il cohésif ? Comment expliquer cette cohésion ?

(iii) Quelle organisation adoptent les micelles de caséines en fonction de la concentration ? Quelle est la structure des dépôts ?

(iv) Quelles sont les propriétés de transfert et de diffusion des dispersions de micelles de caséine ? Comment ces propriétés évoluent avec la concentration ?

Mes travaux de recherche en lien avec ces questions sont présentés dans la partie suivante, *2.2.2. Suspensions concentrées de micelles de caséine*.

A partir de cette caractérisation *hors-procédé*, l'idée était ensuite de revenir à l'opération de filtration en tant que telle et de pouvoir en proposer une description plus juste et plus précise. Toujours à partir de ce travail de caractérisation, un objectif majeur était aussi d'élaborer un modèle de filtration capable de prédire les performances de l'opération. Je m'inspirais pour cela des derniers développements théoriques dans le domaine de la filtration d'espèces colloïdales, qui montraient qu'il était possible de construire des modèles de filtration à partir de la mesure des interactions entre colloïdes en fonction de la concentration.[19–21] Je présente l'ensemble de ces travaux dans la partie *2.2.3. Description et modélisation de la filtration.*

Cette façon d'appréhender le problème de la filtration membranaire du lait était alors très nouvelle au STLO, d'autant que les concepts et outils expérimentaux nécessaires pour mener à bien ce projet - ceux de la physique des colloïdes et de la matière molle - étaient alors peu connus au laboratoire (citons toutefois les travaux de Stéphane Pézennec avec l'IPR de Rennes[22,23] et les collaborations que venaient d'engager Geneviève Gésan-Guiziou avec le laboratoire de rhéologie de Grenoble[24,25]). De mon côté, je n'étais pas non plus particulièrement familier de ces disciplines, mais je m'y suis formé à travers des lectures, une confrontation directe à l'expérience, et surtout certaines collaborations clés comme celle que j'entretiens avec Bernard Cabane depuis 2006.

L'intérêt des physiciens de la matière molle pour les protéines et notamment les protéines alimentaires a semble-t-il toujours existé. Je pense par exemple aux nombreux et excellents articles de Kees de Kruif de l'université d'Utrecht par exemple, décédé en janvier 2016. Mais j'ai le sentiment que cet intérêt s'est encore renforcé à cette époque - encore récente - des années 2000-2005 à travers les travaux de chercheurs comme Peter Schurtenberger et Anna Stradner, actuellement à l'université de Lund, ou encore Raffaele Mezzenga à Zurich par exemple.[26–28] Les orientations que je décidais de prendre au STLO à cette période découlent bien sûr en partie de ce contexte de l'époque.

2.2.2 Suspensions concentrées de micelles de caséine

Il convient dans un premier temps de présenter l'objet *micelle de caséine*[c] tel qu'il était connu en 2006. Sa description n'a pas foncièrement changée depuis, si ce n'est les quelques précisions structurales que mes collègues et moi avons pu apporter ces dernières années et que je détaille un peu après (partie 2.3). Les propriétés physico-chimiques et structurales de la micelle sont étudiées depuis plus de 50 ans et la littérature est extrêmement abondante sur le sujet. Des chercheurs ont même parfois consacré la quasi-totalité de leur carrière à l'étude de la micelle de caséine; parmi lesquels Pieter Walstra (WUR), Douglas Dalgleish (Guelph, Canada), Kees de Kruif (Utrecht), David S. Horne et Carl Holt (Ayr, Ecosse). Je me limite donc ici aux caractéristiques essentielles de la micelle de caséine, en tentant de donner le maximum d'éléments pour la compréhension de la suite.

Les micelles de caséines représentent 80% de la teneur en protéines du lait bovin. Elles sont le fruit de l'association de 4 protéines naturellement désordonnées, les caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ, et de 8% en masse d'ions phosphate P et calcium Ca, présents dans la structure sous la forme de nanoclusters de CaP d'environ 5 nm de diamètre. Les micelles sont synthétisées dans les cellules épithéliales mammaires selon un mécanisme encore non élucidé,[29] et ont la fonction vitale d'apporter au mammifère nouveau-né la quantité de protéines et de minéraux nécessaires à son développement. Les micelles de caséine sont des objets colloïdaux qui présentent une large distribution de taille (40% polydisperse) centrée sur un diamètre moyen compris entre 100 et 200 nm (Fig.5A).[30,31] Ce sont des objets peu denses dans le sens où ils contiennent énormément d'eau, environ 80% en volume, soit une concentration interne en protéine de l'ordre de 230 g/L.[32] La structure de la micelle de caséine, cad la façon dont sont organisés spatialement ces différents constituants (eau - protéines - minéraux), est certainement la question qui a fait le plus débat parmi les chercheurs de la communauté *lait* depuis les années 70.

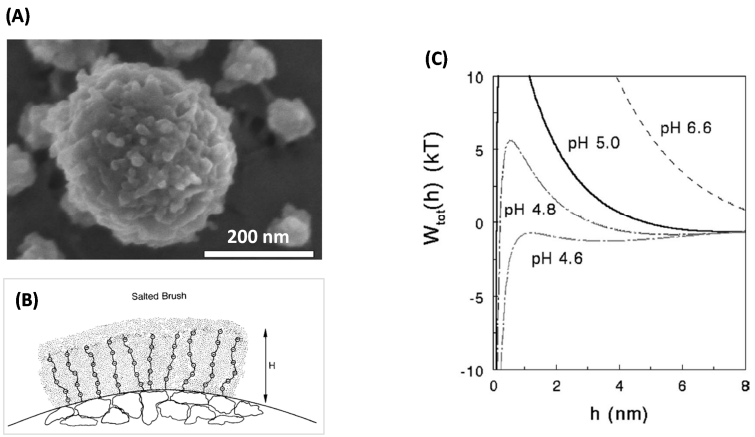

Fig.5. (A) Une micelle de caséine en microscopie électronique à balayage.[31] (B) Brosse de caséine κ à la surface de la micelle.[33] (C) Potentiel d'interaction en fonction du pH et de la distance entre micelles de caséine, selon Tuinier et de Kruif.[34]

[c]Le terme *micelle* est utilisé de façon universelle par les chercheurs du domaine, bien qu'il ne s'agisse pas exactement d'une micelle au sens de l'IUPAC. L'expression *micelle* est plus généralement utilisée par les physiciens pour désigner des objets cœur-couronne simples constitués de molécules tensio-actives.

Aujourd'hui, et comme c'était déjà le cas en 2006, un consensus existe sur la *structuration externe* de la micelle de caséine. Il a effectivement été démontré que la caséine κ est préférentiellement localisée en périphérie de la micelle; formant ainsi une brosse qui assure la stabilité colloïdale de l'objet (Fig.5B).[35] Au pH du lait, la brosse de caséine κ est chargée et parfaitement assimilable à une brosse d'un polyélectrolyte. Toutefois la force ionique du lait est élevée (80 mM) et suffisamment forte pour écranter efficacement les charges. Par conséquent, les répulsions intermicellaires ne sont pas directement de nature électrostatique. Les charges ont pour effet d'assurer la bonne solubilité des brins de caséine κ et ceux-ci agissent alors principalement par effet de répulsion stérique. On parle dans ce cas d'effet *électrostérique*.[36] La Fig.5C donne l'évolution du potentiel d'interaction entre deux micelles en fonction de la distance intermicellaire. Ce potentiel est estimé à partir des caractéristiques des brins de caséine κ et il tient compte des forces d'attraction de Van der Waals aux petites distances. Au pH natif du lait (6.6) le potentiel est clairement répulsif et la dispersion de micelles de caséine est stable. Lorsque le pH est abaissé, la charge des brins de caséine κ diminue, la brosse se déshydrate et se rétracte en partie. La portée des forces de répulsion stérique s'en trouve alors diminuée, ce qui affecte directement le potentiel d'interaction. Jusqu'à pH 4.8, ce potentiel reste encore majoritairement répulsif. A pH 4.6, les répulsions ne sont plus suffisantes pour contrecarrer les forces d'attraction. Les micelles s'agrègent et forment un gel. Le processus de fabrication des gels laitiers de type yaourt est fondé sur ce principe de gélification par diminution du pH. Les gels de type fromage sont quant à eux obtenus par l'action d'une enzyme (la chymosine, présente dans la présure) qui vient sectionner les caséines κ présentes à la surface des micelles.

La question de la *structure interne* de la micelle était et est toujours un sujet beaucoup plus controversé. En effet, les différents constituants de la micelle sont en équilibre complexe avec leur environnement : température, pH, force ionique. La micelle de caséine est par conséquent un objet délicat, dynamique, et difficile à observer dans des conditions représentatives de son état natif. Au début des années 2000, les techniques directes et indirectes d'observation mises en œuvre par les chercheurs avaient finis par dégager un certain nombre de traits caractéristiques de cette structure.[37,38] Mais ces résultats n'étaient pas encore suffisants pour parfaitement discriminer les différents modèles proposés à l'époque; ce qui continuait d'alimenter des débats parfois houleux entre chercheurs.[39–41] Pour faire très bref, les modèles de structure encore en cours en 2006 étaient : (1) les modèles à sous-micelles qui décrivaient la micelle comme un agrégat de sous-unités caséiques de ~15 nm de diamètre contenant les nanoclusters de CaP,[42] (2) les modèles homogènes où protéines et nanoclusters sont distribuées dans la micelle de façon uniforme, les nanoclusters jouant le rôle de liant de la structure par interactions spécifiques avec les résidus phosphoserines des caséines.[38,43] Je reviens sur cette question de la structure interne de la micelle dans la section *(iii) Structuration* de la partie actuelle, et également un peu plus spécifiquement dans la partie 2.3.

(i) Interactions et transition de phase

Articles AI3, AI4

Un des objectifs premiers de mon projet au STLO a été de comprendre et de mesurer les interactions entre micelles de caséine quand on les concentre à des niveaux comparables à ceux obtenus à la surface des membranes de filtration. Il existe plusieurs façons de mesurer des interactions entre espèce colloïdales. Une mesure directe par AFM est possible s'il n'est pas trop difficile d'immobiliser

les espèces sur des surfaces et si l'immobilisation n'entraine pas de dénaturation des espèces.[13] Une mesure indirecte est également envisageable par l'intermédiaire d'informations de structure obtenues par diffusion de rayonnement,[44] mais cette voie peut s'avérer difficile pour des systèmes complexes et polydisperses, et l'accès aux grands instruments est souvent compliqué. Une dernière possibilité consiste à mesurer la variation de pression osmotique de la dispersion en fonction de la concentration en colloïdes. La pression osmotique résulte de l'ensemble des interactions dans le système; elle est une mesure de la résistance du système à sa propre compression ou dégonflement. Pour une dispersion colloïdale simple comme des particules de silice dispersées dans l'eau par exemple, cette résistance résulte des interactions entre les surfaces des particules : plus ces interactions sont répulsives, plus il est difficile de rapprocher les objets les uns des autres en extrayant de l'eau du système, et plus la pression osmotique est grande.

Une technique a priori simple et toujours applicable pour mesurer la pression osmotique d'une dispersion colloïdale est la technique de compression osmotique proposée par Adrian Parsegian et al.[45] La dispersion est placée dans un boudin de dialyse, lui-même immergé dans une solution d'un polymère dont la pression osmotique est connue (Fig.6). Les sacs de dialyse sont choisis de telle façon que les molécules d'eau et les sels peuvent passer les membranes, tandis que le polymère et les colloïdes ne peuvent le faire. Le polymère choisi pour ce type d'expérience est généralement un PEG ou un dextran, dont les valeurs de pression osmotique sont disponibles dans la littérature et rassemblées sur le *web*.[d] Une expérience de compression osmotique peut alors durer jusqu'à 4-6 semaines, temps au cours duquel il y a échange spontané de solvant entre le sac et le réservoir de façon à égaler le potentiel chimique de l'eau dans les deux compartiments. A l'équilibre thermodynamique, la pression osmotique Π dans le sac est identique à celle du réservoir. La concentration *C* en espèces colloïdales dans le sac est mesurée, donnant ainsi un point de la relation Π = f(*C*). Avec cette méthode, il est possible de couvrir environ 3 décades de pressions osmotiques (du kPa au MPa) et d'atteindre des fractions volumiques en colloïdes de l'ordre de 0.5-0.6.

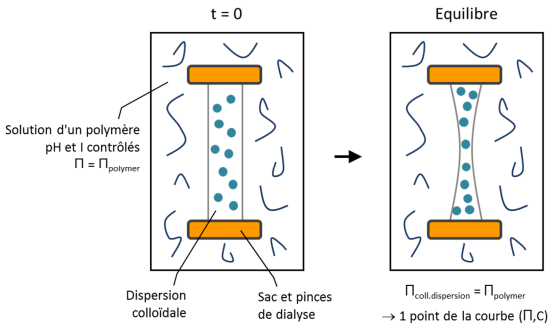

Fig.6. Technique de compression osmotique.

Les pressions osmotiques mesurées de cette façon pour des dispersions de micelles de caséine sont données sur la Fig.7. Aux faibles concentrations en caséine, et jusqu'à environ 125 g/L, les solutions sont turbides et toujours liquides (cf la partie droite de la Fig.7 pour des images des boudins de

[d] https://brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/osfile.html (lien valide au 30/03/2017)

dialyse à l'équilibre). Dans ce régime, Π est directement proportionnelle à *C*, ce qui suggère que les interactions entre micelles sont négligeables et que la pression ne vient que *compter* le nombre d'objets dans les dispersions (analogie de van't Hoff entre solutions et gaz). La pression obtenue est toutefois beaucoup plus grande que celle calculée à partir du nombre de micelles de caséines dans les dispersions, ce qui s'explique par la présence - inévitable - de fragments de micelles et de protéines dans les dispersions. Ces fragments représentent une part infime de la masse en protéines dans la dispersion mais leur densité en nombre est suffisamment élevée pour impacter la pression.

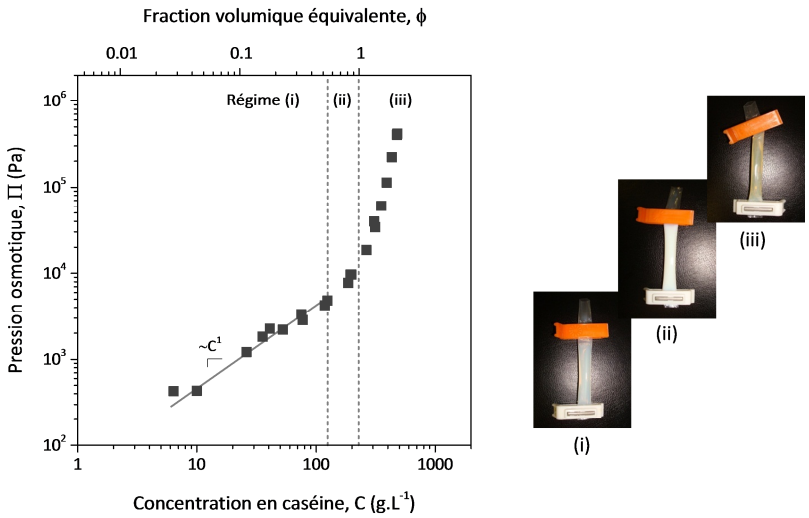

Fig.7. Variation de la pression osmotique de dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration. La fraction volumique en micelle de caséine (axe du haut) est calculée à partir du volume spécifique d'une micelle de caséine native, v = 4.4 mL/g.[30]

Dans un second régime, entre 125 et 230 g/L, la fraction volumique en micelle de caséine, estimée à partir du volume initial de l'objet, passe de 0.55 à 1. On vient donc dépasser la fraction volumique maximum d'un empilement de sphères dures (0.64[46]), ce qui implique que les micelles sont forcées à se rencontrer et à interagir entre elles. La pression osmotique se met alors à diverger avec la concentration et, de manière plus directement palpable, les dispersions passent de l'état liquide à l'état de gel turbide et fragile. Au-delà des 230 g/L, les dispersions résistent beaucoup plus à la compression que dans les régimes précédents, avec une augmentation de la pression osmotique à la puissance 6 avec la concentration. Dans ce cas, les concentrations dans les dispersions sont toutes supérieures à la concentration en caséine dans une micelle *native*. Ce qui implique que de l'eau a nécessairement été extraite de l'intérieur des objets, ceux-ci étant vraisemblablement aux contact les uns des autres dans des configurations de type *nid d'abeille*. Ce sont donc moins les interactions intermicellaires que les interactions intramicellaires qui sont mesurées dans ce régime de concentration. Les dispersions obtenues sont des gels durs et cohésifs qui ont perdu leur turbidité; indication supplémentaire de l'effacement des espaces vides entre micelles à l'entrée de ce régime.

A ce stade, l'analogie entre le comportement de la micelle de caséine est celui d'un microgel (= particule d'un gel, de taille granulaire ou colloïdale) nous est assez naturellement venue à l'esprit :

dans un premier temps la compression rapproche les objets les uns des autres, ils sont ensuite forcé au contact, et enfin après contact la pression les incitent à se dégonfler. A l'époque, la communauté *soft matter* s'intéressait de plus en plus au comportement de ce type d'objets, via les travaux de Michel Cloitre ou Walter Richtering sur des microgels de PNiPAM par exemple.[47,48] Mais il n'existait pas d'étude strictement comparable à la nôtre et rapportant des mesures de pression osmotique (cela est venu un peu après avec les travaux de David Weitz et Paul Menut[49]). Toutefois, à la lecture des travaux émanant de cette communauté, il semblait évident de compléter les mesures de pression osmotique par une caractérisation des propriétés rhéologiques des dispersions de micelles de caséine à mesure que la concentration augmente. La technique de compression osmotique offrait quant à elle la possibilité de produire à façon les échantillons nécessaires à ces mesures. C'est d'ailleurs cette technique de préparation des échantillons que nous avons continué d'utiliser pour la totalité des travaux présentés dans cette partie 2.2.2.

Les résultats de la caractérisation rhéologique des dispersions de micelles de caséine sont réunis sur la figure suivante (Fig.8). L'évolution des propriétés mesurées est parfaitement en phase avec les résultats de compression osmotique et les hypothèses qui s'en dégageaient.

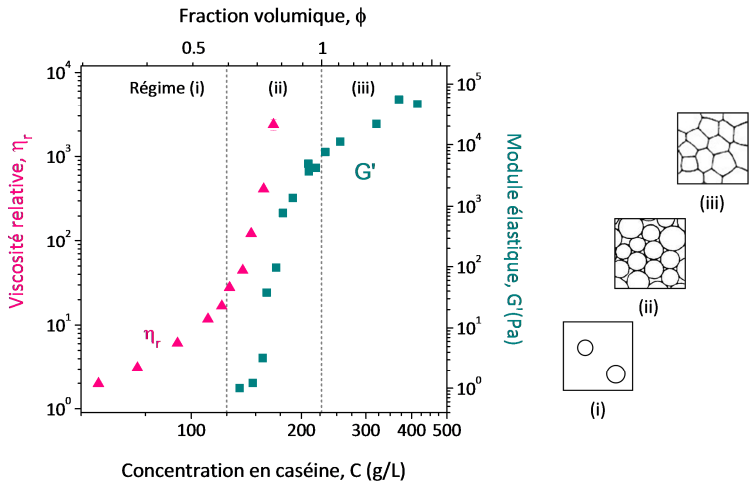

Fig.8. Propriétés rhéologiques de dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration. Les trois régimes de compression mis en évidence par compression osmotique (Fig.7) sont également reportés. Les modules G' sont mesurés à 10 Hz.

Dans le premier régime de concentration, les dispersions sont trop peu concentrées pour présenter un comportement viscoélastique. Seule leur viscosité augmente avec la concentration à la manière d'une suspension de sphères dures. A l'entrée du second régime, le caractère *mou* des micelles de caséines n'est toujours pas sollicité et la viscosité, toujours à l'image de suspensions de sphères dures, diverge à une concentration limite qui correspond à la fraction réelle d'empilement compact de la dispersion (dans ce cas ϕ = 0.78 en raison de la polydispersité de taille des micelles[50]). Dans le second régime, après cette concentration d'empilement compact, la réponse élastique de la dispersion se fait sentir et la variation du G' marque la transition vers un état gel. Enfin dans le troisième régime de concentration, les propriétés des dispersions sont typiques de celles d'un gel,

avec un module élastique G' élevé (Fig.8), plus important que le module visqueux G'', et qui varie peu avec la fréquence de sollicitation (cf article AI4).

A l'occasion de ces travaux, il est apparu qu'une seconde analogie intéressante est celle que l'on peut faire entre ces dispersions de micelles et les émulsions de type huile dans l'eau. Les travaux de Thomas G. Mason et David Weitz sont une référence pour ce qui concerne le comportement des émulsions aux fortes concentrations et jusqu'à la fraction volumique limite de 1.[51,52] Sans rentrer ici dans les détails, nous nous sommes inspirés des modélisations proposées par Mason pour interpréter les données de rhéologie obtenues lorsque les micelles de caséine sont en contact et se déforment les unes contre les autres (régime (ii) et (iii)). Dans une seconde approche, nous avons montré que des modèles de percolation pouvaient aussi expliquer la viscoélasticité des gels de micelles de caséine.[53] Dans ce cas, les propriétés élastiques résultent de la résistance à la déformation de liaisons - permanentes ou non - qui sont créées entre les micelles quand on les force au contact. Ces mêmes liaisons seraient également responsables de la cohésion des gels et de leur irréversibilité partielle, ce que je discute dans la section suivante.

(ii) Réversibilité et forces de cohésion

Articles AI3 et AI12

Il nous a très vite semblé intéressant de tester la réversibilité des gels de caséine obtenus par compression, cad leur propension à se redisperser lorsqu'ils sont remis dans leur solvant (lorsque la pression osmotique est pour ainsi dire *relâchée*). La question est intéressante du point de vue du procédé de filtration, pour le nettoyage des installations lorsque le colmatage a eu lieu par exemple. Elle l'est également du point de vue fondamental et de la connaissance de la micelle de caséine, objet dont le processus de gélification par concentration (*jamming*) était peu connu jusqu'alors; les gélifications pH et présure étant les deux grands phénomènes classiquement étudiés par les chercheurs.

La Fig.9 montre les résultats obtenus après redispersion de gels préparés à des pressions osmotiques correspondant aux régimes (ii) et (iii) discutées précédemment (Fig.7). Dans ce cas, les gels sont resuspendus dans leur solvant (de l'eau et des sels) sous forte agitation pendant 15 h. Après une phase de repos de 4 h, la *fraction de gel* est estimée à partir de la concentration en caséines qui n'ont pas sédimentées. Cette fraction mesure l'irréversibilité du gel dans ces conditions. Pour des micelles de caséine comprimées dans leur environnement ionique natif (carrés noirs), le gel présente toujours une part irréversible, de 20 à 80%, et cette part est d'autant plus grande que les micelles ont été comprimées sévèrement. Cette irréversibilité indique qu'il y a formation de liaisons intermicellaires lors de la compression, et que les liaisons établies sont plus nombreuses et/ou plus fortes à compression élevée. Une information supplémentaire est que le gel est d'autant plus irréversible que les micelles sont comprimées à des forces ioniques élevées (diamants et triangles). Les connections intermicellaires s'établissent donc plus facilement dans ces conditions, avec une dépendance moindre de la cohésion finale envers la pression osmotique de préparation.

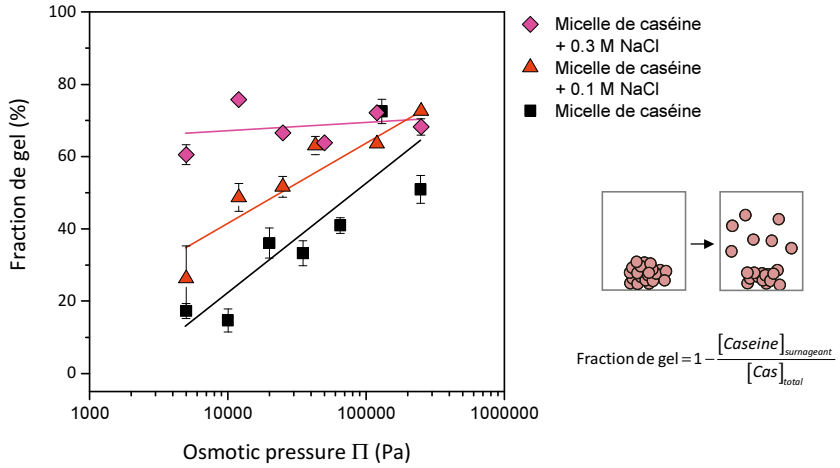

Fig.9. Réversibilité de gels de micelles de caséine obtenus par compression osmotique après resuspension dans leur solvant et 15 h d'agitation. Effet de la présence de NaCl.

Identifier la nature exacte de ces liaisons est une tâche difficile. Elles s'établissent vraisemblablement au moment où la compression est suffisante pour *vaincre* les forces de répulsion de la brosse de caséine κ par un collapse partiel ou total de celle-ci. Plus la compression est forte, plus le contact micelle-micelle est efficace. De la même façon, plus la force ionique est élevée et plus les forces de répulsion électrostériques sont affaiblies et faciles à dépasser; ce qui faciliterait également le contact intermicellaire. Par ailleurs, il est admis que la brosse de caséine κ ne recouvre pas la surface de la micelle de caséine de manière homogène mais qu'elle est plutôt organisée en *patchs* plus ou moins denses et irréguliers.[32] Dans ce cas le collapse de la brosse par compression permettrait aux régions localisées entre ces patchs d'entrer directement en contact. Or les séquences protéiques qui constituent ces régions sont en grande partie hydrophobes,[54] ce qui suggère que les liaisons de surface micelle-micelle sont plutôt de type hydrophobe. A noter que ces liaisons sont très probablement de même nature que celles qui conduisent à la gélification présure d'un lait et qui sont également désignées sous le vocable générique d'*hydrophobe*. En effet dans les deux cas, la gélification intervient par altération/dépassement des répulsions entre micelles, mais sans modification des conditions physico-chimiques de leur environnement.

Dans une seconde étude expérimentale, nous avons tenté d'en savoir plus sur ces liaisons intermicellaires, leur durée de vie et les mécanismes qui conduisent à leur formation. Nous avons pour cela testé la stabilité de gels obtenus sur une plus grande plage de pression osmotique (jusqu'à 100 bar) et en dehors de toute agitation cette fois-ci (Fig.10). La cohésion du gel est estimée à travers un *taux de redispersion*, cad le pourcentage de micelles de caséine qui retournent spontanément de l'état gel à l'état dispersion. Ce taux est mesuré à différents temps d'immersion du gel dans son solvant de façon à suivre d'éventuels effets cinétiques.

En accord avec les résultats précédents, les gels préparés à Π = 0.1 bar sont lâches et peu cohésifs; la compression n'étant pas suffisante dans ce cas pour assurer un contact efficace entre les micelles. Les résultats sont plus surprenants pour les gels préparés à des pressions ≥ 1 bar, notamment en ce qui concerne l'évolution de leur cohésion avec le temps. Aux temps d'immersion les plus courts (4 et

16 h), leur cohésion est quasi-totale et nous sommes là encore en accord qualitatif avec les résultats précédents : la compression a dans tous les cas formé assez de liaisons pour que le gel ne se redisperse pas spontanément (il n'y a pas d'agitation ici, contrairement aux résultats de la Fig.9). Il apparait par contre que ces gels finissent par se redisperser aux temps longs (64 h et 10 jours), et ce d'autant plus qu'ils ont été préparés à des pressions élevées (!). Pour exemple, un gel préparé à Π = 1 bar est à 80% intact après 10 jours de *décompression*, tandis qu'un gel préparé à 100 bar se redisperse totalement dans le même laps de temps (le résultat est particulièrement visible sur la Fig.10B). L'origine de ce phénomène est sans doute à chercher dans les premiers instants de la décompression des gels. En effet, des mesures de teneur en eau sur les gels montrent que les micelles recouvrent leur hydratation d'origine dans ces tout premiers instants, de l'ordre de la minute ou de l'heure. L'hypothèse est que cette relaxation rapide des objets constituant les gels vient rompre ou fragiliser les liaisons intermicellaires par effet mécanique. Dans les gels préparés à 1 bar, les micelles sont comprimées à 60% de leur volume initial, si bien que cet effet de relaxation est encore limité. Dans les gels préparés à 100 bar, les micelles ont 30% de leur volume initial. Lorsqu'elles relaxent à leur volume d'origine, il est envisageable que de nombreuses liaisons intermicellaires soient malmenées et fragilisées. La cohésion de l'ensemble en est alors suffisamment affectée pour que le gel puisse se déliter complètement aux temps longs.

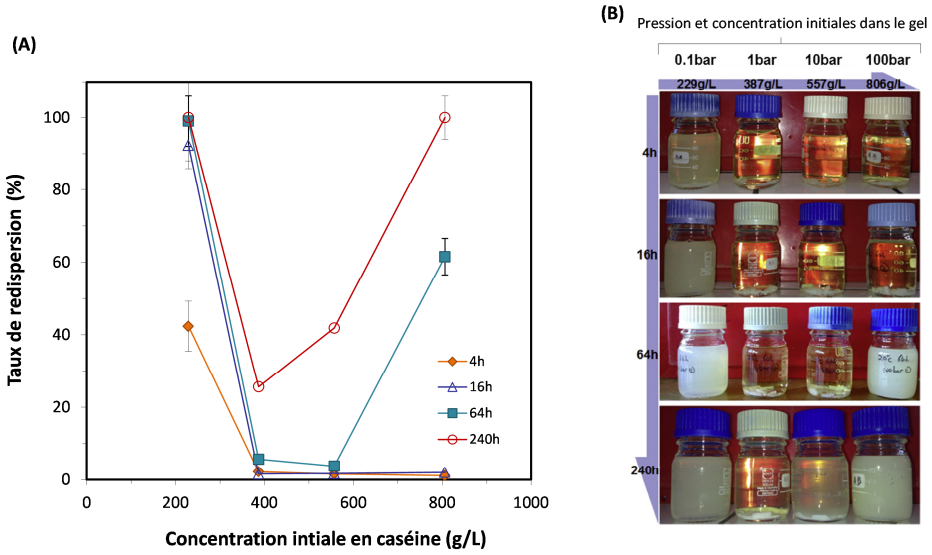

Fig.10. Réversibilité de gels de micelles de caséine obtenus par compression osmotique après resuspension dans leur solvant pendant différents temps, sans agitation.

Afin d'avancer sur cette question de la nature des forces de cohésion entre micelles de caséine, une perspective de ce travail était de mesurer la stabilité des gels en fonction de paramètres physico-chimiques tels que la température ou la présence d'un composé tiers (e.g. urée, sels). Une mesure directe des forces de cohésion micelle-micelle par AFM avait également été envisagée à l'arrivée de l'instrument au STLO. Mon départ pour Toulouse a bien sûr compromis les choses et à ma connaissance personne n'a encore pris le relais sur ce point à Rennes.

(iii) Structuration

Article AI5

Les propriétés discutées dans les sections précédentes suggèrent que lorsqu'on les concentre, les micelles de caséines entrent en contact les unes des autres et forment un gel assimilable à un empilement cohésif de microgels. Il paraissait important de confronter cette vision à des mesures directes de la structure des dispersions et de répondre ainsi à des questions relevant de l'organisation des micelles dans le matériau : l'empilement est-il compact ? Existe-t-il une porosité du gel ? Si oui à quelle(s) échelle(s) ? La diffusion de rayonnement (rayons X, neutrons) aux petits angles est une technique qui permet d'obtenir des informations de structure aux échelles souhaitées (1 Å - 500 nm). Elle est de plus parfaitement adaptée à la micelle de caséine comme en témoignaient, à la fin des années 2000, les déjà nombreuses (et contradictoires) études SANS et SAXS de la structure de la micelle de caséine;[55–58] études pour autant limitées aux faibles concentrations en caséines. Nous avons donc observé par SAXS des dispersions de micelles de caséine préparées par stress osmotique à des concentrations allant jusqu'à 400 g/L. Notons que de premières mesures SAXS avaient déjà été réalisées à mon arrivée au STLO par Geneviève Gésan-Guiziou sur des couches concentrées de micelles de caséine à la surface de membranes de filtration.[24,25] Mais les contraintes techniques de ces manipulations ne permettaient pas de dépasser 0.5-0.6 en fraction volumique (~150 g/L), soit la concentration à partir de laquelle les informations de structure sont véritablement intéressantes.

Les spectres SAXS sont rassemblés sur la Fig.11A. Il s'agit d'une représentation de type *Kratky* $q^2\ I(q) = f(q)$ qui a l'avantage de mettre en évidence les singularités des courbes obtenues. Sur ce type de spectre, la présence d'une oscillation à un vecteur d'onde q marque l'existence d'une distance caractéristique $d \approx 2\pi/q$ au sein de l'échantillon : corrélations positionnelles entre objets, taille des objets, structure interne, présence de vides, etc.

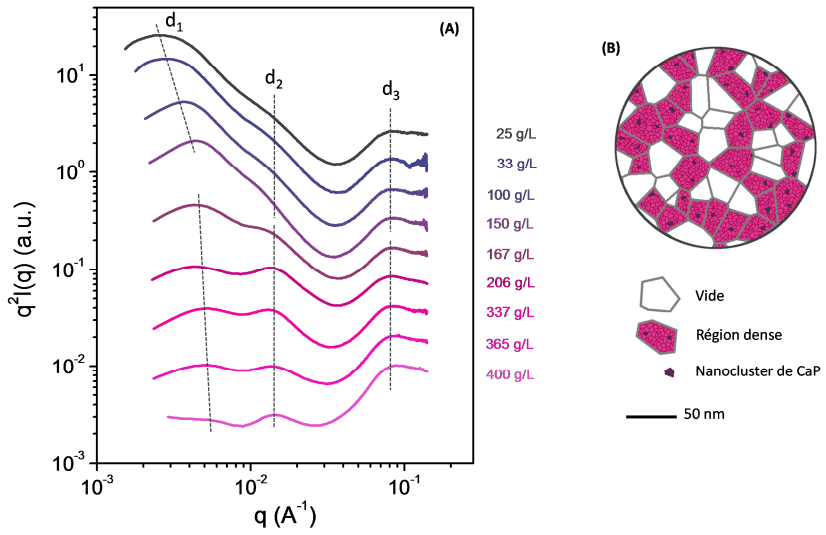

Fig.11. (A) Structure SAXS de dispersions concentrées de micelles de caséine. Les traits pointillés donnent les positions approximatives des trois longueurs caractéristiques de l'objet micelle. (B) Modèle *éponge* de la micelle de caséine

Commençons par décrire le spectre SAXS enregistré à la concentration *native* en caséine dans un lait, C = 25 g/L. Le spectre présente trois bosses caractéristiques. A $q \approx 2\text{-}3.10^{-3}$ Å^{-1}, l'oscillation correspond au contour global de l'objet d'une taille moyenne d_1 de l'ordre de 200 nm. Aux vecteurs d'onde les plus grands ($q \approx 7\text{-}8.10^{-2}$ Å^{-1}), et donc aux échelles de taille les plus petites, l'oscillation correspond aux nanoclusters de phosphate de calcium présents à l'intérieur de l'édifice micellaire, pour un diamètre moyen $d_3 \approx$ 4-5 nm. Aux échelles de taille intermédiaires, la troisième et légère oscillation à $q \approx 2\text{-}3.10^{-3}$ Å^{-1} ($d_2 \approx$ 40 nm) n'avait été que peu reportée au moment de ces mesures. Elle était interprétée différemment selon les auteurs, notamment en tant qu'indication du positionnement privilégié des nanoclusters de CaP à la périphérie interne de la micelle.[57]

Lorsque la concentration est augmentée, le spectre SAXS évolue différemment suivant que les micelles sont séparées les unes des autres (régime (i) et (ii) des Figs.7 et 8, jusqu'à 150 g/L) ou qu'elles interagissent directement entre elles et forment un gel (régime (ii) et (iii), de 150 à 400 g/L) :
. De 25 à 150 g/L, les micelles ne font que se rapprocher les unes des autres. Par conséquent, les distances internes d_2 et d_3 de l'objet n'évoluent pas et les oscillations correspondantes ne changent pas de position en q. L'oscillation à petit q évolue quant à elle vers les plus petites distances. C'est ici la marque classique de l'apparition de corrélations positionnelles entre les objets à mesure qu'on les concentre et non d'une diminution de la taille des objets. Les micelles s'organisent peu à peu entre elles par des effets d'exclusion stérique tout comme dans une dispersion de sphères dures. Cette organisation a pour effet de déprimer l'intensité diffusée à petit q et de décaler le pic d'intensité vers les distances plus faibles.
. De 150 à 400 g/L, le pic d'intensité diffusée à petit q n'évolue plus que très légèrement et s'efface peu à peu au profit des autres oscillations à moyen et grand q. Ceci est tout à fait en accord avec le fait que les micelles entrent au contact et forment un gel continu aux grandes échelles de taille. Le SAXS ne *voit* plus le contour des micelles car il ne distingue plus les interfaces entre objets quand ceux-ci entre en contact (en lien avec la perte de turbidité, cf Fig.7). Le fait que l'intensité diffusée à petit q s'effondre autant suggère que l'empilement est très compact et contient peu de gros vides. L'évolution du spectre à moyen et grand q est beaucoup plus surprenante à première vue. En effet les distances caractéristiques internes d_2 et d_3 de la micelle n'évoluent pas du tout quand la concentration augmente. Nous sommes cependant dans un régime où la micelle est nécessairement déformée et comprimée, jusqu'à perdre la moitié de son volume initial. Comment dès lors expliquer que les distances internes de l'objet ne sont pas affectées par sa propre déformation ? Nous avons proposé que cette déformation *non-affine* de l'édifice micellaire s'explique par l'existence de régions caséiques denses au sein de la micelle. Ces régions, de diamètres compris entre 10-40 nm, résistent à la compression de la micelle et ne changent donc pas de taille d_2. Elles sont entourées de *vides* qui s'effacent petit à petit à la compression en libérant le solvant qu'ils contiennent. D'autre part les régions denses contiennent également les nanoclusters de CaP dont la taille d_3 n'est pas non plus affectée par la compression.

On voit donc ici que ces résultats SAXS nous ont en quelque sorte contraints à proposer un nouveau modèle de structure interne de la micelle de caséine (Fig.11B). Nous avons baptisé ce modèle le *modèle éponge*, terme qui commençait à être utilisé par ailleurs pour décrire des clichés Cryo-TEM de la micelle réalisés à la même période.[37] Ce modèle de structure interne a très vite été accepté par la communauté, et il est à présent régulièrement cité parmi les modèles les plus réalistes.[59,60] D'un

autre côté, il existe une controverse récente concernant l'assignation de la dernière oscillation du spectre SAXS au nanoclusters de CaP.[61–63] Cette discussion ne remet pas directement en cause notre modèle, mais elle témoigne bien de la sensibilité et de la quasi *immuabilité* de cette question de la structure interne de la micelle de caséine, sujet sur lequel je reviens brièvement dans la partie 2.3.

En plus de leur position en vecteur d'onde *q*, les oscillations des spectres SAXS de la Fig.11 se caractérisent par une intensité ou *hauteur* relative I_0. En utilisant un modèle dit *à cellules*, de même type que ceux développés pour décrire des empilements de gouttelettes d'émulsions,[64] il est possible de traduire ces intensités relatives en fractions volumiques des différentes entités présentes dans l'échantillon : ϕ_1 la fraction volumique en micelles dans la dispersion, ϕ_2 la fraction volumique en régions denses dans la micelle, ϕ_3 la fraction volumique en nanoclusters dans les régions denses. L'évolution de ces fractions volumiques avec la concentration en caséine est donnée sur la Fig.12.

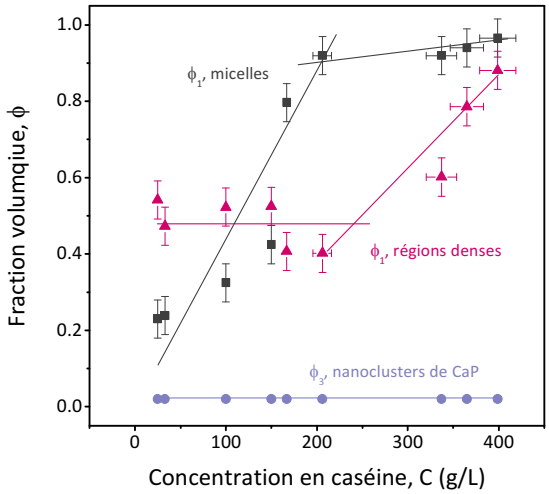

Fig.12. Evolution des fractions volumiques en micelles dans la dispersion (ϕ_0), régions denses dans la micelle (ϕ_1), et nanoclusters dans les régions denses (ϕ_2), en fonction de la concentration totale en caséine dans la dispersion.

Ces résultats apportent des précisions importantes quant à la porosité de l'empilement de micelles de caséine. Ils montrent en effet que les micelles occupent quasiment tout l'espace dans les gels, avec des taux de vide intermicellaire compris entre 10 et 4% seulement en fonction du degré de compression du matériau (carrés noirs, $C > 200$ g/L). Mais la porosité des gels résulte également des vides intramicellaires de taille 10-40 nm. Ces vides représentent environ 50% du volume de la micelle à l'état non compressé, soit aussi ~50% du volume du gel à C ≈ 200 g/L. A 400 g/L, ces vides ne représentent plus que ~10% du volume du gel. La porosité est alors principalement assurée par les distances entre chaines caséiques dans les régions denses, distances que l'on peut estimer à 3-5 nm.[65]

(iv) Propriétés dynamiques et diffusionnelles
Articles AI10, AI14 et AI16

En complément des mesures présentées dans les sections précédentes, nous nous sommes intéressés aux propriétés dynamiques (mobilité des chaines caséiques) et diffusionnelles (mobilité de traceurs au sein des dispersions) des dispersions de micelles de caséine à mesure qu'on les concentre. Ces propriétés ne peuvent être facilement inférées des autres caractéristiques des dispersions et des mesures expérimentales étaient donc indispensables.

La mobilité ou la dynamique d'un système moléculaire peut être caractérisé par RMN en utilisant des séquences particulières d'impulsion radiofréquence. L'aimantation du système est perturbée par une ou plusieurs impulsion(s) et son retour à l'équilibre est suivi en fonction du temps. Le T_2 ou temps de relaxation spin-spin est une mesure parmi d'autres de ce temps de retour à l'équilibre. Dans le cas d'une dispersion d'un polymère, la dynamique des chaines polymériques est caractérisée à travers le T_2 des protons *non-échangeables* appartenant aux chaines en question. Un T_2 grand implique que les chaines sont mobiles et peu contraintes dans leur déplacement. A l'inverse un T_2 petit implique que l'aimantation retourne vite à son état d'équilibre et que les chaines sont peu mobiles, très contraintes et/ou en interaction forte avec leur environnement. Par convention, les résultats d'expériences de relaxation sont plutôt discutés en termes de vitesse de relaxation $1/T_2$. Les vitesses $1/T_2$ mesurées pour des dispersions concentrées de micelles de caséine sont reportées dans la figure suivante (Fig.13). Les expériences ont été réalisées sur les instruments RMN de l'IRSTEA de Rennes, en collaboration avec François Mariette, chercheur dans cet institut.

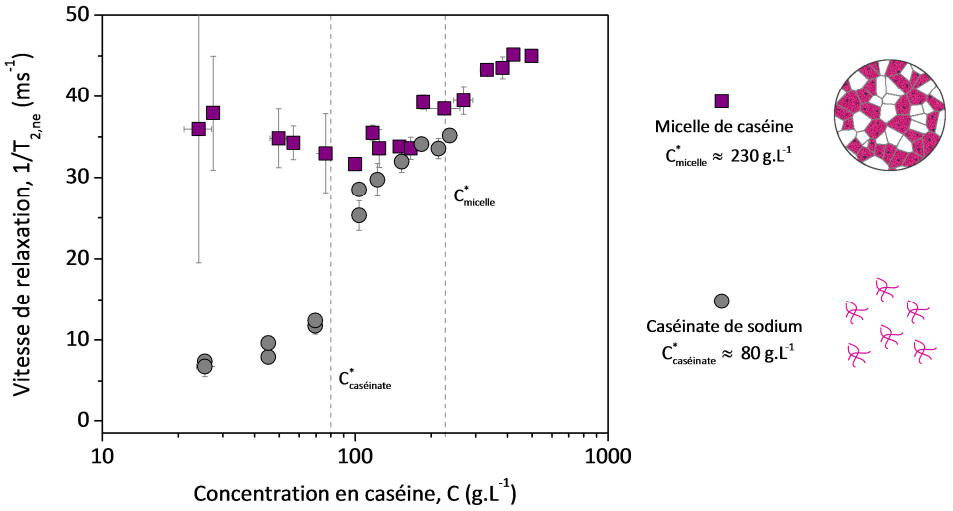

Fig.13. Vitesse de relaxation RMN $1/T_2$ des protons non échangeables des protéines dans des dispersions ce caséines micellaires et non micellaires. Variation en fonction de la concentration en caséine. Les C^* sont les concentrations en caséine dans les objets : micelle de caséine dans un cas, petits agrégats caséiques très hydratés dans l'autre.

Ces mesures indiquent que la mobilité des chaines caséiques n'est pratiquement pas affectée par la concentration dans une gamme allant de 25 à 150 g/L en caséine (carrés mauves). Ce résultat

s'explique par le fait que les micelles de caséine ne font que se rapprocher les unes des autres à ces concentrations et qu'elles ne sont encore ni déformées ni comprimées. Les caséines qui les constituent ne subissent aucune contrainte supplémentaire quand la concentration augmente, et leur mobilité est donc inchangée. A partir de 150 g/L, la vitesse de relaxation $1/T_2$ augmente cette fois-ci légèrement indiquant une diminution de la mobilité des chaines caséiques. Les interactions entre micelles et la compression des objets les uns contre les autres semblent donc suffisantes pour impacter la mobilité de chaines les constituant. Des expériences de RMN du solide que nous avons publiées récemment viennent confirmer et préciser ce phénomène (article AI16). Ces expériences suggèrent que l'augmentation des contraintes stériques à la compression de la micelle incite les brins de caséines à interagir beaucoup plus fortement avec les nanoclusters de CaP qui leur sont proches. La perte de mobilité des chaines observée sur la Fig.13 serait donc en partie liée à ces phénomènes d'interaction caséine-CaP aux fortes compressions. A titre d'illustration, la Fig.13 reporte les vitesses de relaxation $1/T_2$ mesurées pour des dispersions de caséines non structurées en micelles car exemptes de Ca et P (caséinate de sodium, cercles grisés). Dans ce cas, les brins de caséine se structurent en petits agrégats de quelques chaines très hydratés et supposément beaucoup plus lâches qu'une micelle de caséine.[66] Aux faibles concentrations, les valeurs de $1/T_2$ indiquent que les chaines caséiques sont effectivement beaucoup plus mobiles que celles constituant les micelles. Aux concentrations plus élevées, et de la même façon que pour les micelles, les vitesses de relaxation augmentent quand les agrégats entrent en contact et s'enchevêtrent les uns dans les autres.

Dans un second temps, nous avons étudié la dynamique et la mobilité de petites molécules dans les dispersions de micelles de caséine et déterminé en quoi cette mobilité est affectée par la concentration du système. L'indicateur à privilégier dans ce cas est bien sûr le coefficient de diffusion de l'espèce. Nous avons mesuré ce coefficient pour des traceurs de natures variées, dans des dispersions de caséine préparées à façon par stress osmotique. Les résultats de ces expériences sont donnés dans la Fig.14.

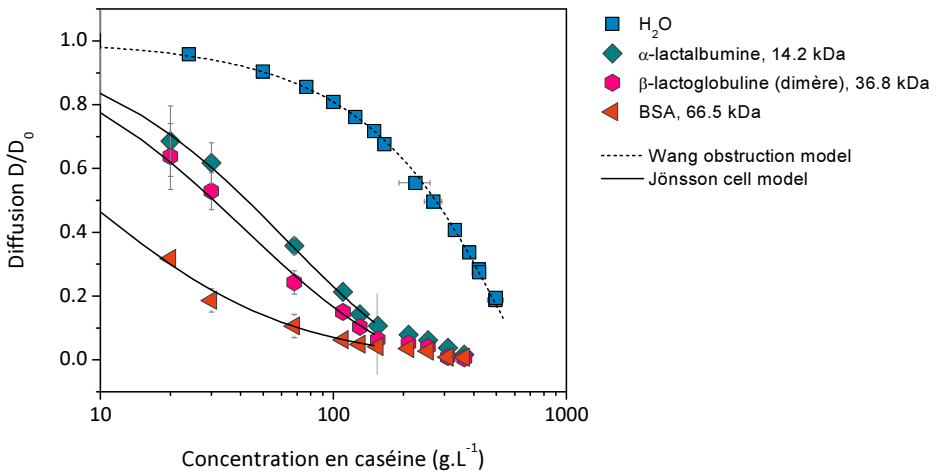

Fig.14. Diffusion des molécules d'eau et de traceurs protéiques dans des dispersions concentrées de micelles de caséine. Les coefficients de diffusion sont normalisés par le coefficient de diffusion D_0 mesuré pour chaque entité à concentration nulle en caséine.

Les mesures de diffusion de l'eau ont été réalisées par RMN, toujours dans le cadre de notre collaboration avec l'IRSTEA. La technique dite à gradients de champ magnétique pulsé a été utilisée. Elle mesure le coefficient d'autodiffusion de l'eau D qui peut être normalisé par sa diffusion D_0 à concentration nulle en caséine. Sans surprise, le D/D_0 de l'eau diminue à mesure que la concentration en caséine augmente, jusqu'à atteindre 20% de sa valeur initiale à 500 g/L de caséines. Pour interpréter cette diminution, différents modèles peuvent être utilisés. Une option raisonnable est de choisir un modèle à obstruction du même type que celui proposé par Wang et al. pour décrire la diffusion de l'eau dans des solutions de protéines pures.[67,68] Dans ce modèle, la perte de diffusivité de l'eau est due à des phénomènes d'obstruction (une partie du volume n'est pas accessible) couplés à des effets d'hydratation qui *ralentissent* les molécules d'eau en interactions avec les protéines. Ce modèle est parfaitement adapté à nos résultats sur l'ensemble de la gamme de concentration explorée (cf Fig.14). Par ailleurs ce modèle ne tient pas compte de la porosité du milieu, ce qui suggère que la diffusion de l'eau est insensible à l'évolution de la porosité avec la concentration (Fig.12). Ceci parait tout à fait plausible dans la mesure où les échelles de taille de la porosité des dispersions et des gels (3-100 nm) sont dans tous les cas très supérieures à la taille d'une molécule d'eau (3 Å). En d'autres termes, la molécule d'eau est un traceur trop petit pour être influencé par la structure des dispersions et des gels dans la gamme de concentration étudiée.

Les mesures de diffusion de traceurs protéiques (α-lactalbumine, β-lactoglobuline, BSA) ont été réalisées au STLO par microscopie confocale FRAP. Les espèces sont initialement dispersées de façon homogène dans le medium et c'est aussi leur diffusion brownienne qui est mesurée dans ce cas. Ces trois traceurs ont été choisis parce que ce sont des protéines du lait qui sont amenées à diffuser à travers les couches concentrées de micelles de caséines sur les membranes de microfiltration. Ces trois protéines ont de plus des masses moléculaires et donc des tailles différentes, de 4 à 7 nm de diamètre hydrodynamique. La Fig.14 montre que la diminution de la diffusion en fonction de la concentration en caséine est beaucoup plus marquée pour ces trois traceurs que pour les molécules d'eau. Aussi contrairement au traceur *eau*, la structuration du système a ici un rôle déterminant sur la diffusion des traceurs. En effet dans un premier régime de concentration, pour $C < 150$ g/L, les traceurs peuvent à la fois diffuser entre et à l'intérieur des micelles. Dans ce régime les traceurs perdent leur diffusivité à mesure que les vides intermicellaires s'effacent quand la concentration augmente. Dans un second régime, à $C > 150$ g/L, les traceurs diffusent très majoritairement à l'intérieur des micelles empilées dans le gel. La diffusion est alors très ralentie et dépend nettement moins de la concentration. Nous avons modélisé la perte de diffusion dans le premier régime de concentration uniquement, en utilisant le *cell model* proposé par Bo Jönsson et Håkan Wennerström.[69] Ce modèle considère que la diffusion globale d'un traceur dépend simplement de sa concentration et de ses propriétés de diffusion dans les deux compartiments que constituent l'extérieur de la micelle (les vides intermicellaires) et la structure interne de la micelle. Par identification du modèle avec nos données expérimentales, nous avons montré que les traceurs protéiques sont présents en très grand nombre à l'intérieur des micelles, et que ce nombre est d'autant plus important que le traceur est gros. Ce résultat, relativement contre-intuitif, s'explique probablement par des effets non-spécifiques d'attraction protéines-caséine, avec des points de contact et d'attraction plus nombreux entre les parois internes de la micelle et la protéine quand celle-ci a une taille hydrodynamique importante.

2.2.3 Description et modélisation de la filtration
Articles AI6, AI9 et AI11

Pour rappel, l'idée maitresse (le pari ?) de mon projet au STLO était qu'une caractérisation fine des systèmes caséiques réalisée *hors procédé* devait nécessairement apporter des éléments clés de compréhension des opérations de filtration des industries laitières. Cette stratégie n'avait de sens que si l'on confrontait effectivement les observations obtenues *ex-situ* à la réalité des opérations de filtration. Une première confrontation de ce type a été réalisée à la faveur des résultats de thèse d'Anne Jimenez, doctorante de Geneviève Gésan-Guiziou qui avait débuté sa thèse peu avant mon arrivée au STLO. Ce travail, résolument axé sur la conduite et l'optimisation de l'opération de filtration, consistait notamment à déterminer quelles sont les conditions opératoires *critiques* à partir desquelles la filtration n'est plus performante. Le principe des expériences effectuées en ce sens est illustré sur la Fig.15A.

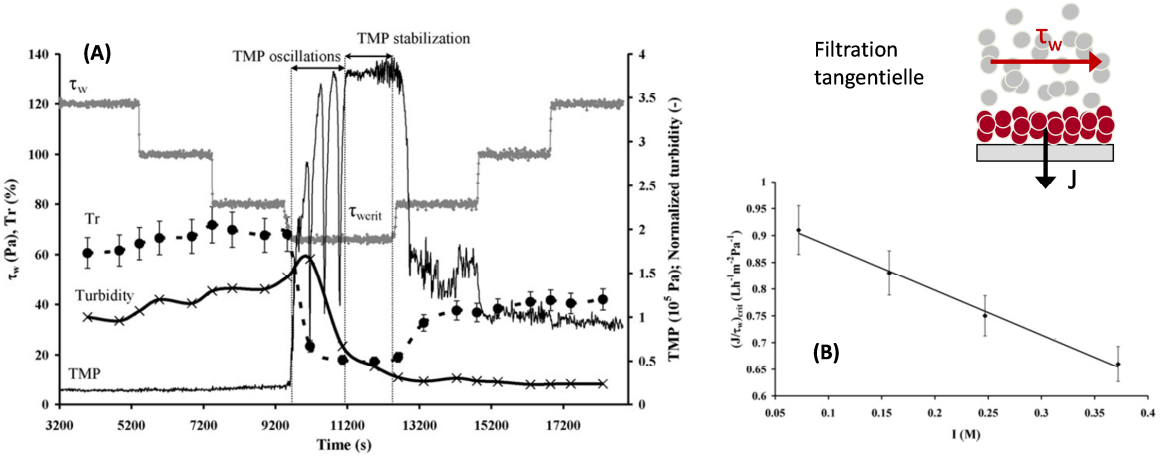

Fig.15. (A) Principe des expériences de microfiltration tangentielle réalisées par Anne Jimenez au cours de sa thèse (article AI6 et Jimenez et al.[17]). (B) Evolution du ratio critique (J/τ_w) en fonction de la force ionique (ajout de NaCl).

Il s'agit d'expériences de microfiltration tangentielle pour lesquelles le fluide filtré - un lait écrémé - circule parallèlement à la membrane à une vitesse donnée. Cette vitesse de recirculation peut être changée à volonté et se caractérise à travers une contrainte de cisaillement à la paroi τ_w, contrainte d'autant plus forte que la vitesse est grande. La filtration est menée de façon à ce que le flux de perméation *J* soit constant tout au long de l'expérience. La filtration débute à une vitesse de recirculation suffisamment importante pour limiter l'accumulation des micelles de caséine à la surface membranaire par les effets déjà évoqués de *shear-induced back-diffusion*. La pression hydrostatique nécessaire pour pousser le fluide à travers la membrane (TMP) est alors stable à 0.2 bar. Aussi 60% des protéines solubles sont transmises à travers la membrane (Tr = transmission), indiquant que la séparation caséine-protéine est particulièrement efficace. A l'issue de cette première étape, la vitesse de recirculation est abaissée par paliers successifs sur des durées d'environ 30 minutes chacun. Les performances de la filtration en termes de pression transmembranaire et transmission en protéines sont stables et inchangées jusqu'à ce que τ_w atteigne une valeur critique

τ_{wcrit}. A cette valeur critique, la pression transmembranaire augmente fortement, oscille, et atteint des valeurs clairement déraisonnables du point de vue énergétique pour une microfiltration. Cette *explosion* de la pression transmembranaire résulte de la formation d'un gel de micelles de caséine à la membrane. Les oscillations de pression témoignent du caractère cohésif de ce gel : il est régulièrement décollé par le cisaillement puis se reforme aussitôt. La transmission des protéines solubles est quant à elle directement affectée par la présence du gel et chute à 20%. Une fois que les conditions critiques sont atteintes, la contrainte τ_w est augmentée à nouveau par palier. Les performances de la filtration ne sont alors pas parfaitement recouvrées. Ceci indique qu'une partie du gel est restée sur la membrane, confirmant ainsi son caractère cohésif et en partie irréversible.

Les conditions hydrodynamiques critiques à partir desquelles la conduite de la filtration devient instable sont définies par le ratio critique $(J/\tau_w)_{crit.}$ Ce ratio représente le rapport entre le flux de matière convectif vers la membrane et le flux de rétrodiffusion de la membrane vers le *bulk* (il est en ce sens parfaitement assimilable au nombre adimensionnel de Péclet). Un résultat important de la thèse d'Anne Jimenez est d'avoir montré que les valeurs de $(J/\tau_w)_{crit}$ étaient liées à la quantité d'ions présents dans les laits écrémés (Fig.15B). Lorsque la force ionique est augmentée, $(J/\tau_w)_{crit}$ diminue indiquant que le gel se forme à des taux de cisaillement plus grands à même flux convectif. En d'autres termes, le gel se forme plus facilement et donc vraisemblablement à des concentrations en micelles de caséine plus faibles quand les laits sont dopés en ions. De plus les courbes de pression transmembranaire obtenues à différentes forces ioniques selon le principe de la Fig.15A indiquent clairement que la cohésion et l'irréversibilité des gels augmentent avec la force ionique. Le parallèle entre ces résultats et nos premières expériences de compression osmotique (partie 2.2.2, section (i)) était assez direct et évident. Les compressions osmotiques opérées à des forces ioniques élevées montrent que la transition sol-gel intervient en effet à des concentrations en caséines plus faibles (cf article AI3). Les propriétés de cohésion des gels préparés par stress osmotique, telles que nous les avons discutées précédemment (Fig.9), sont également en parfaite adéquation avec les résultats de filtration à différentes forces ioniques. Avec les résultats de caractérisation *ex-situ* des dispersions denses de micelles de caséine, nous venions ainsi corroborer les hypothèses émises pour expliquer les résultats de filtration.

Dans le cadre de la thèse de Peng Qu que j'ai codirigée au STLO, nous avons continué d'étudier ces liens entre filtration et propriétés des dispersions de caséines mesurées hors filtration. Nous nous sommes limités au cas simple d'une filtration *frontale* de solutions modèles de micelles de caséine. Il s'agissait selon moi d'une étape obligée vers la compréhension et la modélisation de la filtration tangentielle du lait, mode évidemment privilégié dans l'industrie. En filtration frontale, il n'existe aucune recirculation ou agitation du fluide filtré côté retentât (Fig.16A). Les micelles de caséines s'accumulent à la surface membranaire et forment un gradient de concentration de la membrane vers le *bulk*. A ce gradient de concentration correspond un gradient de pression osmotique également représenté sur la Fig.16A. Lorsque la concentration en micelles de caséine dépasse une certaine concentration critique - et donc une pression osmotique critique Π_{crit} - il y a formation du gel à la membrane.

Selon une méthode mise au point par des collègues du LGC, il est possible de déterminer la valeur de Π_{crit} à partir d'une succession de filtrations frontales opérées à pression constante.[70] Dans une première étude sur laquelle je ne reviendrai pas en détails ici (article AI9), nous avons montré que le

Π_{crit} ainsi obtenu été parfaitement comparable à la pression osmotique de transition sol-gel déterminée par compression osmotique. De manière tout à fait intéressante, on observe toutefois que la formation d'un gel irréversible se fait à une pression osmotique (et donc une concentration) légèrement plus élevée en filtration qu'en mode *statique :* 35 kPa contre 10 kPa. Cette différence pourrait s'expliquer par des effets cinétiques, la filtration étant conduite sur des temps plus courts que les compressions osmotiques, ce qui laisserait moins de temps aux connections intermicellaires pour s'établir correctement. La différence pourrait également être due au caractère fondamentalement hors équilibre de la filtration et à l'écoulement ininterrompu du fluide à travers les dépôts dans ce cas (contrairement au stress osmotique). Les forces hydrodynamiques générées par l'écoulement pourraient alors, d'une manière ou d'une autre, contribuer à une plus grande résistance de la dispersion vis à vis de la compression.

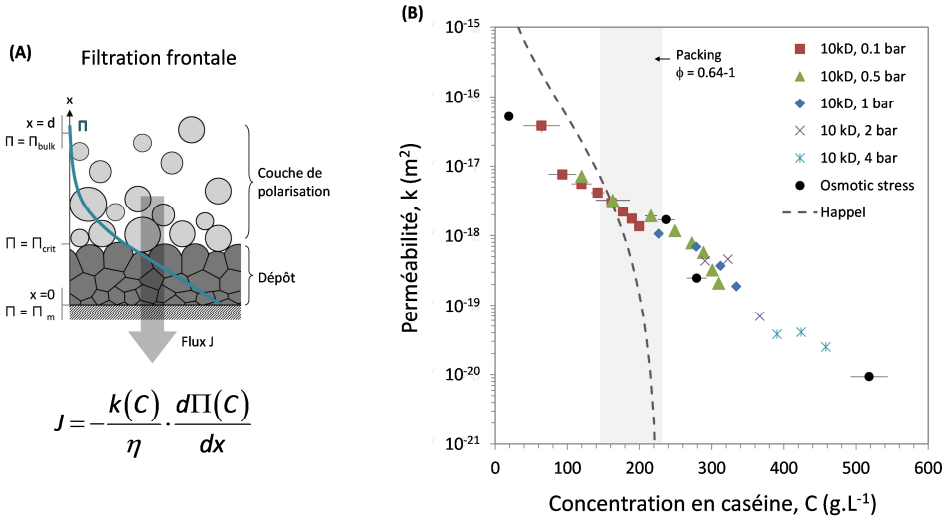

Fig.16. (A) Filtration frontale d'une solution colloïdale d'objets déformables et poreux. (B) Perméabilité des dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration.

Dans une seconde étude concernant la filtration frontale (article AI11), nous avons porté notre attention sur la modélisation des phénomènes et sur l'établissement d'un outil prédictif des performances de l'opération. Nous nous sommes pour cela inspirés des approches de modélisation proposées par des chercheurs comme William Bowen, Menachem Elimelech, ou Patrice Bacchin.[19–21] Ces approches ont été développées pour décrire la filtration frontale de colloïdes de type sphères dures. Dans ce cas la couche de colloïdes accumulés à la paroi de la membrane est décrite par un *classique* équilibre convection - diffusion. Toutefois il est nécessaire d'injecter dans le modèle un paramètre qui rende compte des interactions entre les colloïdes; ce paramètre étant bien sûr la pression osmotique de la dispersion. En suivant une démarche similaire, nous avons proposé que la filtration de toute espèce colloïdale, dure ou *molle*, pouvait in-fine répondre à l'équation donnée sur la Fig.16A ci-dessus. Cette équation permet de prédire le flux de filtration *J* moyennant la connaissance de deux paramètres essentiels : la pression osmotique Π, paramètre d'interactions, et la perméabilité *k*, paramètre qui rend compte de la résistance hydrodynamique à l'écoulement dans la structure de la dispersion ou du gel.

Les expériences de stress osmotique décrites dans la partie 2.2.2 nous avaient permis de déterminer expérimentalement la variation de la pression osmotique avec la concentration (Fig.7). Restait donc à déterminer la perméabilité *k* des dispersions de micelles de caséine pour pouvoir construire le modèle. Pour des solutions de sphères dures impénétrables, et moyennant la concentration et la taille des objets, la perméabilité *k* peut être estimée tout à fait directement à travers l'expression théorique de Happel.[71] Dans le cas de la micelle de caséine, objet déformable, perméable et très polydisperse, aucun modèle théorique n'était et n'est encore capable d'estimer *k*. Il est cependant possible de mesurer ce paramètre expérimentalement et c'est ce que nous avons fait à travers deux approches distinctes : (i) le suivi cinétique d'expériences de stress osmotique, (ii) l'utilisation *reverse* de l'équation de la Fig.16 et le suivi de filtrations opérées à pression constante. Le résultat de ces mesures est donné dans la Fig.16B. Avant empilement compact des micelles dans les dispersions (C < 150 g/L), la perméabilité est assurée par les vides intermicellaires. Assez logiquement, les valeurs atteintes sont alors comparables à ce que prévoit le modèle de Happel pour des dispersions de sphères dures de tailles identiques (trait pointillé). La perméabilité mesurée est cependant systématiquement inférieure au modèle de Happel dans cette gamme de concentration. On ne peut expliquer ceci par le caractère poreux des objets, les dispersions d'objets de ce type ayant toujours des perméabilités supérieures à celles de dispersions de sphères non poreuses de même taille.[72] Nous attribuons donc cette différence à la présence de fragments de micelles et de caséines dans les espaces intermicellaires; fragments qui influent également sur la pression osmotique des dispersions (cf Fig.7). Après empilement compact des micelles et formation d'un gel (C > 150 g/), la perméabilité est cette fois essentiellement assurée par la porosité interne de la micelle. Elle est de fait supérieure à ce que prévoit Happel pour des sphères dures, et elle diminue régulièrement avec la concentration à mesure que le gel se comprime et que les vides intramicellaires s'effacent.

En utilisant les évolutions mesurées de Π et *k* en fonction de la concentration en caséine, nous avons construit le modèle permettant de décrire et prédire la filtration. Un exemple d'utilisation de ce modèle est donné dans la figure suivante (Fig.17). Il s'agit ici des calculs obtenus pour une filtration *virtuelle* opérée à une pression transmembranaire ΔP de 1 bar.

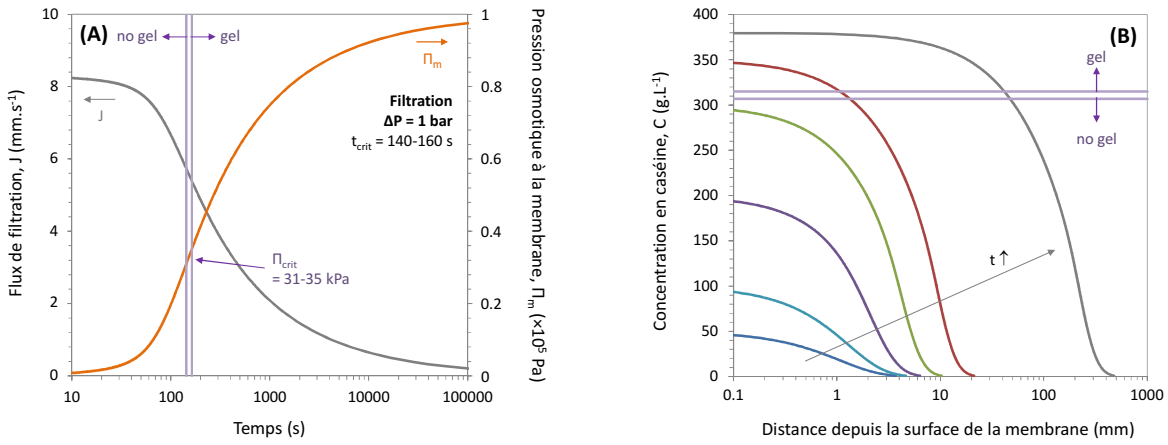

Fig.17. Modélisation de la filtration frontale de dispersions de micelles de caséine à ΔP = 1 bar. (A) Evolution du flux et de la pression osmotique à la membrane en fonction du temps. (B) Evolution du gradient de concentration en caséine à la surface de la membrane en fonction du temps (6 s, 14 s, 43 s, 128 s, 456 s, 2.3 j).

La première *sortie* du modèle est bien sûr l'évolution du flux de perméation *J* avec le temps (Fig.17A), information qui intéresse directement l'utilisateur de la filtration. Le modèle permet également de calculer l'évolution de la pression osmotique à la surface de la membrane en fonction du temps (Fig.17A). Il s'agit là d'une information particulièrement intéressante pour l'utilisateur. En effet, lorsque cette pression dépasse la valeur critique Π_{crit} que nous avons déterminée par ailleurs (article AI9), le gel de micelle de caséine commence à se former à la membrane, marquant ainsi le début du colmatage irréversible de l'installation. Le modèle permet ainsi de déterminer le temps critique de filtration à partir duquel il y a passage vers un colmatage irréversible (entre 100 et 200 s pour l'exemple de la Fig.17A). Sur la Fig.17B sont portées les valeurs calculées par le modèle des concentrations en caséine dans la couche de polarisation à différents temps de filtration. Ces calculs permettent d'estimer l'épaisseur de la couche colmatante en fonction du temps, autre information importante pour l'opérateur.

Les perspectives de ces travaux de modélisation sont de deux ordres. Le premier aspect concerne l'adaptation du modèle à la filtration du lait en mode tangentiel, ce qui semble tout à fait possible moyennant une étude fine des phénomènes de rétrodiffusion hydrodynamiques à la membrane. Ce travail est actuellement en cours au STLO dans le cadre de la thèse de Floriane Doudiès dirigée par Geneviève Gésan-Guiziou et débutée en septembre 2016 (je ne suis pas partie prenante de ce travail mais vais participer au comité de suivi de la thèse). Le second aspect, qui me semble réellement capital, concerne la modélisation de la sélectivité de la filtration et donc de la transmission des protéines solubles en fonction des paramètres opératoires. Le problème est compliqué et nécessite à mon sens plusieurs années de travail. Je n'ai pas discuté récemment des orientations de recherche en ce sens au STLO. Mais il ne fait aucun doute que les données de structure, de porosité et de diffusivité qui sont présentées dans la section 2.2.2 pourront aider à l'établissement d'un tel modèle à l'avenir.

2.3 Structure de la micelle de caséine

Articles AI8 et AI13

Comme expliqué précédemment, la question de la structure de la micelle est un sujet que j'ai abordé relativement fortuitement à travers des expériences SAXS sur des dispersions concentrées de micelles de caséine (Fig.11). L'arrivée du microscope AFM au STLO a été pour moi une première occasion de revenir sur cette question. Un avantage majeur de la technique AFM est de pouvoir prendre des images topographiques d'un objet en milieu liquide, à la seule condition de l'avoir préalablement immobilisé sur une surface. A l'inverse des techniques de microscopie optique ou électronique, il semblait donc possible de visualiser par AFM la micelle de caséine dans son état natif et son environnement aqueux naturel.[73,74] Ma collègue Fanny Guyomarc'h est moi-même nous sommes attelés à cette tâche avec l'aide précieuse de Mustapha Ouanezar alors étudiant M2 au STLO.

La Fig.18A est un exemple d'image AFM obtenue en milieu aqueux au pH et à la composition ionique du lait. Les micelles sont immobilisées sur une surface d'or via une chimie EDC/NHS. Elles se déforment légèrement lors de cette immobilisation mais leur volume n'en est pas affecté. On peut donc raisonnablement considérer que c'est une micelle de caséine quasi *intacte* que montre cette image. La surface externe de la micelle apparait comme particulièrement rugueuse et hétérogène. Notre hypothèse est que ces irrégularités de surface sont le reflet des hétérogénéités internes de la micelle de caséine telles que nous les avons mises en évidence par SAXS (le modèle *éponge*...). Les échelles de taille des hétérogénéités de surface (AFM) et de volume (SAXS) sont d'ailleurs parfaitement compatibles, entre 10 et 50 nm.

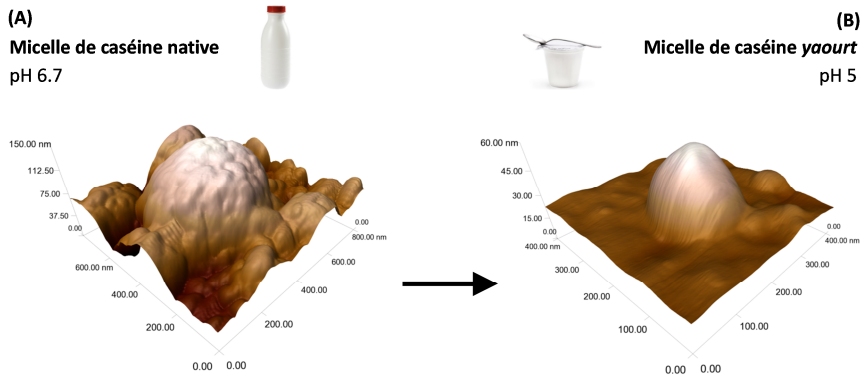

Fig.18. Images AFM d'une micelle de caséine dans son environnement natif (pH 6.7) et après acidification (pH 5).

La Fig.18B est une image AFM de la micelle de caséine après acidification de son environnement aqueux à pH 5. A ce pH, les micelles d'un lait sont agrégées les unes aux autres et forment un gel de type *yaourt*. La Fig.18B est en quelque sorte l'image d'*une* brique élémentaire constituant ce type de gel. On y voit une micelle beaucoup plus petite, plus ramassée, et également beaucoup plus lisse en surface que dans son état natif. La perte de volume, estimée à 50-75% du volume initial, s'explique par une neutralisation quasi totale des charges des caséines (pI ≈ 4.6) et un processus d'agrégation et

de gélification interne à la micelle. Des résultats SAXS de collègues de l'université de Lund suggèrent par ailleurs que cette compaction de la micelle s'accompagne d'une perte des hétérogénéités de sa structure interne.[36] L'aspect lisse observé par AFM serait donc le résultat, en surface, de cette meilleure homogénéité interne de l'objet à pH 5.

C'est à travers des expériences SANS de variation de contraste que j'ai continué de travailler sur la structure interne de la micelle. L'idée de ces expériences revient à Bernard Cabane et à son souvenir des travaux historiques d'Heinrich B. Stuhrmann concernant les hétérogénéités de structure et de composition de la ferritine et d'autres protéines.[75,76] La variation de contraste en SANS repose sur le fait que les neutrons interagissent très différemment avec les atomes d'hydrogène H et de deutérium D. En substituant D à H à des degrés variables dans un échantillon aqueux, il est ainsi possible de moduler distinctement les interactions des neutrons avec le solvant, les particules qui y sont dispersées, et les différents constituants des particules. La façon dont le spectre SANS évolue avec ce changement de *contraste* renseigne alors directement sur la composition et la structure des particules. H.B. Stuhrmann propose de se concentrer sur la partie du spectre de diffusion enregistrée aux petits vecteurs d'onde q. Dans cette zone, le signal SANS est traité selon l'approximation de Guinier et donne accès au rayon de giration de la particule R_g et à l'intensité diffusée à angle nul I_0. Je ne reviens pas ici sur l'interprétation de la variation de I_0 avec le contraste, qui n'est pas directement intéressante dans le cas de la micelle de caséine. L'évolution du R_g avec le contraste donne quant à elle accès à la variation radiale de composition interne des particules. Pour des particules exemptes de telles variations de composition interne, R_g n'évolue pas avec le contraste. Pour des objets de type cœur-couronne, Stuhrmann a démontré que $(R_g)^2$ évolue linéairement avec l'inverse du contraste moyen des particules $1/\varrho$ (Fig.19A).

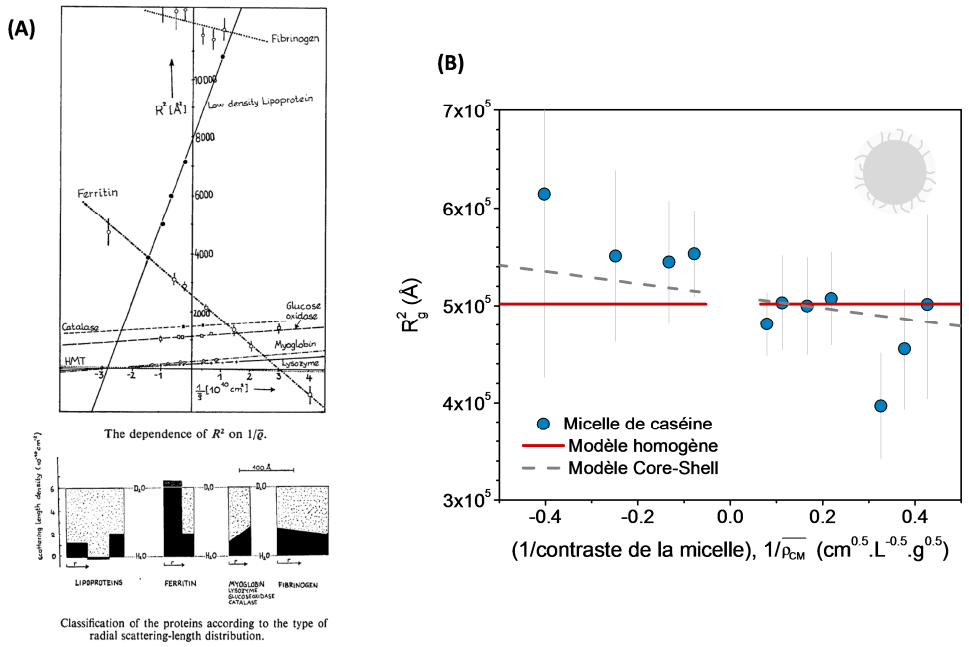

Fig.19. (A) Principe de l'analyse de Stuhrmann d'une expérience de variation de contraste SANS. Le rayon de giration R_g d'une particule présentant une variation radiale de composition évolue avec le contraste moyen de la particule ϱ selon une loi linéaire $(R_g)^2 = f(1/\varrho)$. (B) Analyse de Stuhrmann pour la micelle de caséine.

Dans le cas de la micelle de caséine, la méthode de Stuhrmann paraissait particulièrement appropriée pour examiner comment les nanoclusters de CaP sont distribués dans l'édifice micellaire, question soulevée par différents auteurs à l'époque.[57,77] La variation du rayon de giration de la micelle en fonction de son contraste est portée sur la Fig.19B. Nous trouvons que cette variation est en faveur d'une micelle cœur-couronne du point de vue de la distribution en nanoclusters CaP, avec un diminution nette de $(R_g)^2$ avec $1/\varrho$. Le fait que nous observons une diminution de $(R_g)^2$ plutôt qu'une augmentation indique que la couronne est moins dense que le cœur. La variation expérimentale est alors proche de ce qu'un modèle prévoit pour un objet de distribution radiale uniforme en CaP dans le cœur, et dont la couronne est exempte de CaP et constituée uniquement de brins de caséine κ (modèle Core-Shell, Fig.19B). Ces résultats viennent ainsi confirmer la présence d'une brosse à la surface de la micelle et en préciser la composition. Ils sont également en accord avec une structure interne de type *éponge* formée par agrégation aléatoire de sous-unités caséique denses et contenant les nanoclusters de CaP.

Suite à ce travail, Bernard Cabane m'a proposé récemment de participer à une étude similaire de variation de contraste SANS sur un système constitué de vésicules lipidiques et d'une protéine impliquée dans la maladie de Parkinson, l'α-synucléine. L'objectif est de caractériser les interactions lipides-protéines et de déterminer en quoi ces interactions sont responsables de la dénaturation de l'α-synucléine et de la formation de fibrilles amyloïdes. Il s'agit d'un travail en collaboration avec Emma Spaar et Sarah Linse de l'université de Lund.[78] Une première série d'expériences a été réalisée fin 2016. Les résultats obtenus sont en cours d'analyse.

2.4 Interactions et structuration aux fortes concentrations

Je décris ici brièvement les travaux que j'ai démarrés en parallèle de mon activité principale de recherche sur la micelle de caséine. Ils sont dans tous les cas liés à cette thématique, soit à travers les approches et techniques expérimentales utilisées, soit à travers les questions génériques abordées. Il s'agit pour la plupart de travaux en cours qui ne sont pas encore complètement finalisés et valorisés. Je ne les considère pas pour autant comme faisant partie de mes perspectives de recherches puisqu'ils ne concernent pas la thématique qui m'occupe à présent au LISBP (partie 3).

2.4.1 Protéines globulaires (en cours)

Article AI15

Les phénomènes d'interactions et de structuration dans les solutions denses de protéines intéressent au premier chef des collègues du STLO et de l'IPR de Rennes - Stéphane Pézennec et Sylvie Beaufils - pour leur lien potentiel avec le comportement des protéines à l'interface eau-air (cf description de la thèse de Coralie Pasquier, partie 1.3). Les protéines modèles sont des protéines du lait ou de l'œuf : lysozyme, ovalbumine, α-lactalbumine, utilisées dans l'industrie pour leurs propriétés moussantes notamment. Nous avons étudié le comportement de ces protéines par des approches tout à fait similaires à celles utilisées pour caractériser les systèmes de micelles de caséine aux fortes concentrations.

Nous avons récemment publié les résultats concernant le lysozyme, petite protéine globulaire de 14 kDa et ~3 nm de diamètre. Cette protéine est très bien caractérisée du point de vue biochimique mais son comportement aux fortes concentrations est assez peu documenté. Seules quelques études - parfois contradictoires - traitent de ses propriétés de *self-interaction* dans ces conditions, mais dans une gamme de concentration qui reste limitée aux fractions volumiques < 0.2-0.3.[27,79,80] Dans notre étude, nous avons utilisé les techniques de compression osmotique et de sorption dynamique pour mesurer la pression osmotique de solutions de lysozyme - et donc les interactions entre objets - dans une gamme de concentration la plus large possible. Quelques-uns des résultats obtenus sont donnés sur la Fig.20.

Comme pour la micelle de caséine, l'évolution de la pression avec la concentration peut se décrire suivant trois régimes de compression. Mais la comparaison s'arrête ici puisque les mécanismes mis en jeu sont très différents dans le cas du lysozyme. Dans le régime dilué, la pression mesurée est légèrement supérieure à celle attendue pour des particules ponctuelles n'interagissant pas entre elles (van't Hoff), ou des sphères dures interagissant par des effets de volume exclu (Carnahan-Starling). Compte tenu de l'absence d'impuretés peptidiques dans les solutions, cette différence ne peut s'expliquer que par des effets de répulsion électrostatique forte entre protéines. Un calcul théorique de la pression osmotique à partir de la charge de surface du lysozyme et de la force ionique de la solution nous a permis de confirmer cette hypothèse (cf article AI15).

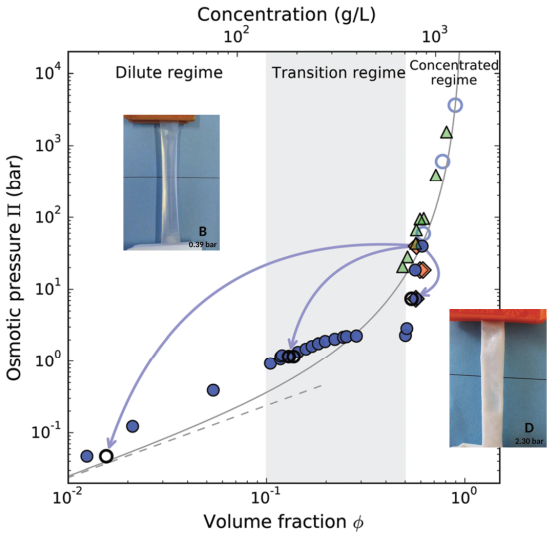

Fig.20. Evolution de la pression osmotique de solutions de lysozyme avec la concentration; pH 7 et force ionique 20 mM. Ligne pointillée : équation de Van't Hoff. Ligne continue : équation de Carnahan-Starling pour une solution de sphères dures. Les flèches indiquent les chemins choisis pour les expériences de *décompression* osmotique.

Dans le second régime de concentration, l'évolution de la pression osmotique avec la concentration devient très surprenante. L'augmentation est de moins en moins marquée et un plateau de pression osmotique est atteint en fin de régime. En conséquence la pression osmotique reste quasiment stable à $\Pi \approx 2$ bar pour des fractions volumiques comprise entre 0.2 et 0.5 (!). Il s'agit en fait ici de la signature d'une transition de phase liquide-solide, et plus particulièrement de la cristallisation du lysozyme. En effet des agrégats blanchâtres apparaissent peu à peu dans les sacs de dialyse et des spectres SAXS obtenus par ailleurs montrent la présence effective de cristaux dans les solutions.

Enfin à partir d'une fraction volumique de 0.5, la pression osmotique augmente à nouveau et de façon très rapide avec la concentration. Dans ce cas toutes les protéines ont cristallisés et la pression osmotique est une mesure de la résistance à la compression de l'empilement des cristaux dans la solution.

De façon tout à fait importante, nous trouvons que la compression est parfaitement réversible : lorsqu'une solution initialement fortement comprimée et entièrement cristallisée est *décomprimée* à une pression osmotique plus faible, elle revient à une concentration identique à celle atteinte par compression directe. Autrement dit, la position des points de la courbe $\Pi=f(\phi)$ ne dépend pas du chemin utilisé pour les atteindre. Tous ces points sont donc des points d'équilibre thermodynamique. La courbe de la Fig.20 est alors assimilable à une *équation d'état* du lysozyme dans les conditions physico-chimiques utilisées. Une partie de l'article que nous consacrons au lysozyme est dédiée à l'évolution de cette équation d'état en fonction de la charge de l'objet (variation de pH) et de l'écrantage de cette charge (force ionique).

Les résultats concernant l'ovalbumine, la mesure de ses interactions par stress osmotique, et la structure SAXS des solutions comprimées, font l'objet d'un article en cours de préparation (article AP4). Sans rentrer dans les détails ici, nous trouvons que le comportement de cette protéine est très

différent de celui du lysozyme pour une charge nette qui est cependant similaire à pH 7 (Z/e = -9.5 et 8.3 pour l'ovalbumine et le lysozyme, respectivement). En particulier, aucune cristallisation n'est observée pour l'ovalbumine, sa pression osmotique augmente régulièrement avec la concentration, et Π est très peu sensible à la force ionique du solvant. Ces différences de comportement pourraient résulter d'effets d'interactions spécifiques entre les protéines et les cations et anions minéraux présents dans les solutions; interactions de natures supposément très différentes quand la protéine est chargée négativement ou positivement. De manière tout à fait intéressante, on retrouve ce comportement différencié de l'ovalbumine et du lysozyme lorsqu'on s'intéresse à la façon dont les deux protéines s'accumulent à l'interface eau-air. Un article est en préparation sur ce point (article AP3). Il se fonde sur des expériences de réflectivité de neutrons auxquelles j'ai participé avec mes collègues rennais.

2.4.2 Microgels (en cours)

Le comportement d'objets *déformables*, *compressibles* et *perméables* en filtration est une question particulièrement intéressante. Elle dépasse de loin le seul cas de la micelle de caséine et concerne de nombreux autres objets *mous* manipulés dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, ou du traitement de l'eau : constructions protéiques diverses, objets biologiques, flocs... Cependant cette question a été peu abordée jusqu'à présent et elle commence seulement maintenant à intéresser les chercheurs des communautés *soft matter* et du génie des procédés.[49,81–83]

Les microgels sont un modèle idéal pour des recherches génériques sur le comportement des objets mous et poreux en filtration : ils sont facilement synthétisables et leur taille et propriétés élastiques peuvent être modulées à façon. A mon passage au LGC de 2011-2013, j'ai réalisé une première étude visant à suivre la filtration de ce type d'objet (stage de Florian Lange, 2012). J'ai choisi d'utiliser des microgels de dexMa, dextran modifié par adjonction de fonctions méthacrylate, synthétisés par un processus d'émulsification-polymérisation.[84,85] Les microgels de ce type ont des tailles comprises entre 10 et 50 µm (Fig.21A), et c'était là un critère essentiel dans mon cas. En effet l'idée était de suivre la filtration de dispersions de ces objets par microscopie optique dans les dispositifs de filtration spécifiques représentés sur la Fig.21B. Ces dispositifs ou *micro-séparateurs* étaient de fait disponibles au LGC car développés et utilisés depuis quelques temps par les chercheurs de ce laboratoire pour étudier la filtration de particules de latex par exemple.[86,87] Ces microséparateurs sont réalisés en PDMS. La partie filtrante consiste en un alignement de canaux droits de section rectangulaire 50 x 5 µm de sorte à ce que les microgels soient tous parfaitement retenus par la *membrane*. Les résultats de cette première étude expérimentale ont été plutôt intéressants. Nous avons par exemple mis évidence des phénomènes de compaction/relaxation du dépôt en fonction des paramètres opératoires. Nous avons également observé qu'il existe une pression de filtration critique à partir de laquelle les microgels sont poussés à travers les pores par des effets de déformation et de compression individuelle des objets.

Forts de ces premières observations, Martine Meireles du LGC et moi-même avons décidé de continuer de travailler sur ces questions avec la thèse d'Izabella de Aguiar débutée en octobre 2013 et qui s'achèvera fin 2017 (cf partie 1.3). Pour ce travail, notre choix a été de regarder au plus près comment les microgels s'organisent et réagissent collectivement à la compression par des approches

à la fois de filtration et de compression par centrifugation et stress osmotique. Je ne présente pas ici les travaux les moins aboutis et encore en cours qui concernent les aspects filtration et centrifugation. Pour une présentation des dispositifs expérimentaux dans ces deux cas, je renvoie cependant à la lecture de deux articles des collègues néerlandais avec qui nous travaillons : van de Laar et al,[88] Krebs et al.[89]

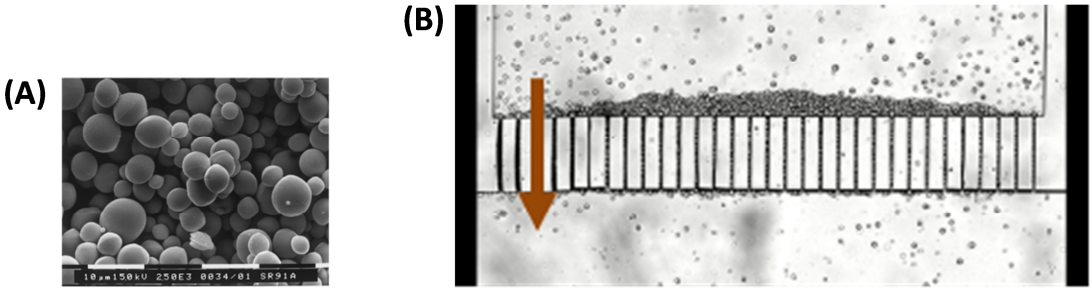

Fig.21. (A) Cliché MEB de particules de microgels de dextran *dexMA* (barre blanche = 10 µm).[84] (B) Accumulation de microgels de 10 µm à l'entrée de canaux de 5 µm lors d'une filtration sur microséparateur.

La figure suivante est un aperçu des résultats que nous devrions soumettre pour publication dans les prochains mois (article AP1). L'objectif est ici de caractériser la résistance à la déformation d'un empilement de microgels et de comprendre dans quelles mesures cette résistance est liée à la structure de l'empilement et aux propriétés intrinsèques des microgels. Pour cela nous avons mesuré la pression osmotique de dispersions de microgels de dextran à différents degrés de compression (Fig.22). Nous avons parallèlement acquis des images en microscopie confocale de ces dispersions, comme illustré sur cette même figure. Avec de telles images, il est possible de quantifier le degré de déformation et de compression des microgels dans les dispersions.

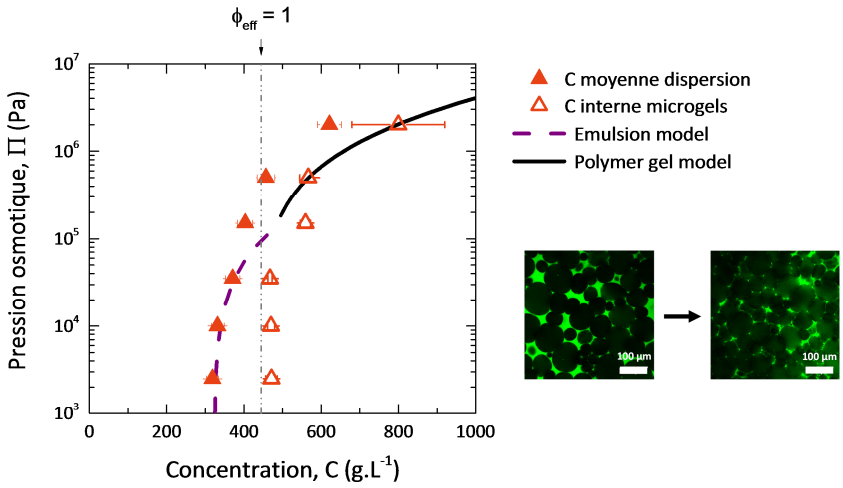

Fig.22. Evolution de la pression osmotique d'un empilement de particules d'un microgel de dexMA en fonction de la concentration en polymère. Exemple d'images de microscopie confocale des empilements.

Les microgels étant de tailles microniques, ils sédimentent et tombent au fond des sacs de dialyse avant compression (Π = 0). Par conséquent dès les pressions les plus faibles, les microgels sont au contact et empilés les uns sur les autres (cf première image confocal). En début de compression, au niveau des 2-3 premiers points de pression osmotique, nos résultats de microscopie indiquent que les microgels se déforment mais ne se *dégonflent* pas ou très peu. Dans ce régime de compression, l'empilement de microgels se comporterait donc comme une dispersion concentrée de gouttelettes d'émulsions vis à vis d'une augmentation de la concentration : les objets se déforment les uns contre les autres sans perdre de volume. Un modèle de pression osmotique élaboré pour des émulsions est en effet capable de décrire l'évolution de la pression dans ce régime (courbe pointillée mauve) Ce modèle permet de relier la pression osmotique à la fraction volumique en microgels dans l'empilement, et donc la concentration moyenne en polymère dans le système (triangles pleins). A des concentrations supérieures, le même modèle n'est plus capable de décrire l'évolution de la pression, suggérant que les microgels répondent à la compression par un autre mécanisme que la déformation. Les images de microscopie montrent effectivement que les microgels perdent cette fois-ci de leur volume interne à la compression. Dans ce cas un modèle qui vient à l'esprit est celui proposé par Menut et Weitz pour des empilements très denses de microgels (courbe noire).[49] La pression osmotique ne dépend alors plus de la concentration moyenne en polymère dans la dispersion, mais directement de la concentration en polymère à l'intérieur des particules de microgel (triangles vides).

3 Perspectives de recherche

Catching enzymes in action: Soft matter approaches to enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass

Je ne traite dans cette partie que des activités de recherche en lien avec ma nouvelle thématique au LISBP, à savoir la dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique. Le sous-titre choisi, en langue anglaise, est celui d'un projet JCJC que j'ai soumis à l'ANR en octobre 2016. Le projet n'a pas été retenu mais son intitulé résume assez simplement la problématique et les approches que je présente dans la suite. Voici un peu plus de trois ans que j'ai entamé ce virage vers une nouvelle thématique, temps pendant lequel mes réflexions et intentions ont peu à peu muries et gagnées en assurance. Pendant cette période, j'ai obtenu de premiers résultats intéressants, qui, s'ils ne sont pas encore vraiment valorisables, viennent conforter les orientations que j'ai choisi de prendre pour cette nouvelle étape dans mon parcours de chercheur.

3.1 Contexte et questions

LISBP et équipe d'accueil

Le LISBP, laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés est une UMR INRA-CNRS-INSA implantée sur le campus de l'INSA de Toulouse. Environ 340 personnes y travaillent dont ~80 chercheurs et enseignants-chercheurs, ~115 ingénieurs, techniciens et administratifs, et ~100 doctorants et post-doctorants. Les recherches menées au LISBP se veulent à l'interface entre les sciences du vivant et les sciences des procédés, avec des applications variées dans les secteurs de la santé, des biotechnologies, de l'environnement, des agro-industries et de la chimie. A l'heure actuelle, 12 équipes de recherche composent le LISBP (http://www.lisbp.fr/fr/la_recherche.html). Dans les prochains mois (le laboratoire est en cours de restructuration), ces équipes seront réparties dans les 5 départements de recherche suivants : 1. Catalyse et ingénierie enzymatique, 2. Ingénierie métabolique, 3. Physiologie bactérienne, 4. Ingénierie microbiologique, 5. Génie des (bio-)procédés. A la différence du STLO, le LISBP ne se distingue pas par un ou des *objet(s)* en particulier (l'œuf, le lait...). Les agents INRA travaillent donc sur des objets variés (protéines, enzymes, bactéries), mais bien sûr toujours en lien avec des problématiques ciblées et à visées finalisées. Une des particularités du laboratoire est peut-être également la structure TWB (Toulouse white biotechnologie), UMS INRA-CNRS-INSA et démonstrateur pré-industriel qui vient s'adosser au LISBP et qui - entre autres choses - facilite les échanges entre les partenaires industriels membre de TWB (Total, L'Oréal, Michelin, Roquette...) et les chercheurs du LISBP.

J'appartiens à l'équipe TIM (transfert, interface, mélange) du LISBP; équipe qui rejoindra le futur département *génie des (bio-)procédés* du laboratoire. Les scientifiques de TIM sont très majoritairement des enseignants-chercheurs de l'INSA (10 au total). Mickaël Castelain, CR dans l'équipe depuis 2014, et moi-même sommes les deux seuls agents INRA de l'équipe. L'équipe TIM revendique une approche générique des questions du génie des procédés, avec des activités de recherches sur systèmes modèles et visant à découpler et comprendre les mécanismes qui régissent un procédé quel qu'il soit. L'équipe est structurée en deux axes de recherches :

(i) un axe qui vise principalement à comprendre et simuler les phénomènes de transfert et l'hydrodynamique dans des écoulements spécifiques (e.g. conduites pétrolières) et des procédés de type échangeurs gaz-liquide ou bioréacteurs de fermentation. Les échelles abordées sont plutôt macroscopiques, et les approches à la fois expérimentales et de simulation numérique : mécanique des fluides, modèles à bilans de population.
(ii) un axe qui vise à caractériser et élucider, aux échelles micro- et mésoscopiques, les mécanismes élémentaires d'interactions et de réactivité mis en œuvre dans des opérations variées de type filtration, flottation, et... dégradation enzymatique. Les approches suivies sont essentiellement expérimentales, avec bien sûr une volonté de modéliser les phénomènes mis en jeu. Les compétences relèvent ici moins du génie des procédés que de la physico-chimie ou de la (bio-)physique.

Mes recherches se positionnent dans le deuxième axe de recherche de TIM et concernent la dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique (cf partie suivante). J'ai choisi d'aborder cette thématique à travers une approche similaire à celle que j'ai développée au STLO qui se fonde sur une caractérisation *physique* des processus, aux petites échelles et sur des systèmes modèles (section 3.2). L'idée est assez nouvelle au LISBP, et mon - modeste - objectif est d'apporter par ce moyen une vision inédite des processus catalytiques, au niveau du laboratoire et au-delà. Je ne travaille pour autant pas complètement isolément sur ces approches au LISBP et collabore étroitement sur le sujet avec deux chercheurs INRA de l'équipe (et bientôt département) c*atalyse et ingénierie enzymatique,* Cédric Montanier et Claire Dumon.

Déconstruction enzymatique de la biomasse lignocellulosique

Le contexte global est la valorisation de la biomasse lignocellulosique (= paroi des cellules végétales, résidus de l'agriculture) en énergie ou composés intermédiaires à haute valeur ajoutée (Fig.23).[90,91] Un des objectifs de l'INRA est de contribuer à la maitrise et l'optimisation des procédés mis en œuvre pour cette valorisation.

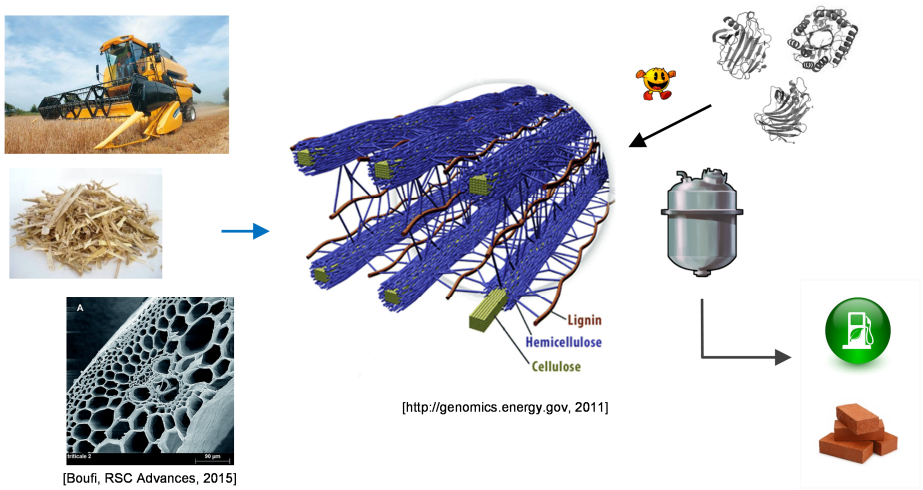

Fig.23. Valorisation de la biomasse lignocellulosique par des procédés centrés sur une déconstruction enzymatique du matériau.

La biomasse lignocellulosique est constituée de différentes *couches*, elles-mêmes de composition et structure hétérogènes (Fig.23). Pour faire bref, la paroi végétale primaire est composée de celluloses et d'hémicelluloses, imbriquées les unes dans les autres. La paroi secondaire est quant à elle principalement constituée de lignine, polymère aromatique. De par sa composition et sa structure, la biomasse est naturellement très résistante à sa déconstruction; que ce soit par voie chimique ou enzymatique. C'est ce qu'on appelle la *récalcitrance* de la biomasse.[92,93] La déconstruction de la biomasse par des enzymes est un processus naturel, que l'on exploite à l'échelle industrielle pour obtenir des sucres élémentaires (convertis in-fine en biocarburant dit de deuxième génération comme le bioéthanol), ou, éventuellement, en autres produits élémentaires pour la production de bioplastiques par exemple.

In-vivo, les bactéries ou champignons synthétisent un mélange complexe de différents enzymes pour parvenir à dégrader le matériau lignocellulosique. Ces enzymes, spécifiques de tel ou tel composant, vont agir en synergie pour que la déconstruction soit optimale. Il y a deux stratégies : (i) les enzymes sont secrétées par les micro-organismes, et vont donc attaquer le matériau de manière indépendante et *libre*, (ii) les enzymes restent accrochées à la surface des bactéries, sur une sorte d'*échafaudage* (le cellulosome) qui regroupe des enzymes de différentes natures.[94] Dans tous les cas, l'attaque in-vivo ne se fait pas en solution, mais au sein du fruit qui *pourrit*, à proximité d'un champignon qui attaque l'écorce d'un arbre, ou encore dans les composteurs de nos jardins. Il est difficile d'estimer la concentration en eau dans de telles situations, mais elle est probablement suffisante pour assurer la mobilité des enzymes et/ou des bactéries. Toujours in-vivo, il s'agit donc pour l'enzyme, ou la bactérie recouverte d'enzymes, de se frayer un chemin ou sein de la structure tout en la déconstruisant. In-vivo, on peut donc parler d'une dégradation dans un milieu hétérogène et qui a lieu principalement à des interfaces liquide-solide.

Dans l'industrie, le procédé utilise également des cocktails d'enzymes mis en œuvre dans des conditions permettant aux enzymes de pénétrer au mieux dans les structures pour les dégrader. Le substrat réel est un substrat insoluble et particulaire : broyats de paille de blé ou autres résidus d'exploitations forestières ou agricoles. Il est dégradé en milieu aqueux dans des bioréacteurs fonctionnants à des concentrations de l'ordre de 10-20% en matière sèche. La réaction est soit directe - le cocktail enzymatique est ajouté à la solution - soit médiée par un consortium microbien qui lui-même produit les enzymes de dégradation. Là aussi nous pouvons parler de réactions catalytiques en milieu hétérogène, qui ont lieu aux interfaces liquide-solide ou dans des conditions de concentration probablement très élevées quand les enzymes pénètrent le matériau pour le dégrader.

Il existe encore peu de procédés permettant d'obtenir du bioéthanol de deuxième génération par voie enzymatique (voir le projet futurol par exemple : http://www.projetfuturol.com/). Dans ce cas, seule la partie cellulosique de la plante est utilisée. Le procédé consiste à séparer mécaniquement et chimiquement la cellulose de l'hémicellulose et de la lignine, puis (ou de façon concomitante) de soumettre l'extrait cellulosique à des cocktails enzymatiques visant à continuer cette séparation et à aller jusqu'au glucose. L'opération finale vise à transformer le glucose en éthanol par fermentation. L'un des challenges pour ce type de procédé est d'optimiser les cocktails enzymatiques de façon à en utiliser moins et à ce qu'ils soient les plus efficaces possibles.

Le second challenge industriel consiste à aller plus loin dans la valorisation de la plante et de parvenir à dégrader tout aussi complètement la lignine et l'hémicellulose. Concernant l'hémicellulose, la voie enzymatique est parfaitement envisageable,[95] mais les exemples industriels sont encore peu nombreux, toujours pour des raisons d'optimisation du procédé et de coût des opérations (production des enzymes notamment).

Questions spécifiques

Parmi les voies d'investigation actuelles pour l'amélioration des procédés, on trouve (a) le développement de nouvelles techniques de prétraitement (chimiques, mécaniques) avant l'étape de déconstruction enzymatique,[96] (b) la découverte de nouvelles enzymes plus efficaces,[97,98] (c) une meilleure identification de la façon dont les enzymes dégradent leur substrat, (d) la compréhension des relations entre la structure des enzymes et leurs fonctions enzymatiques. Je me place quant à moi dans le cadre des points (c) et (d), et m'intéresse donc au déroulement et à l'efficacité de l'action enzymatique, ainsi qu'aux déterminants structuraux de cette action enzymatique.

Les communautés des biologistes et des biochimistes sont bien entendu les premières à s'être intéressées à ces problématiques; les recherches visant à caractériser le fonctionnement des enzymes d'un point de vue moléculaire (quels acides aminés sont mis en jeu ? quelles conditions optimales de pH et de température ?),[99] et à établir des classifications permettant d'appréhender leur diversité biologique.[100] A l'heure actuelle, la problématique de la dégradation enzymatique de la biomasse est encore principalement abordée de ce point de vue, avec donc un accent mis sur l'enzyme en tant que tel et sa caractérisation *biochimique*. Or classiquement, cette caractérisation est menée dans des conditions d'hydrolyse très particulières, c'est à dire vis à vis d'un substrat soluble et en solution diluée.[101,102] Nous sommes donc ici très loin des conditions industrielles d'hydrolyse. Une première série de questions concerne donc le déroulement de l'action enzymatique dans des situations *réelles* de fonctionnement (point (c)). Comme déjà évoqué, un aspect fondamental de cette réalité est que les enzymes sont confrontées à un substrat majoritairement insoluble et particulaire, et sont donc ainsi contraintes de travailler à l'interface entre le substrat et la solution où elles sont dispersées et/ou dans des conditions locales de très fortes concentrations et donc de grand confinement spatial (Fig.24A). Un autre aspect important est la complexité de composition du substrat et des interactions entre ses différents composés (cellulose-hémicellulose, lignine-cellulose, etc.). Les enzymes doivent nécessairement composer avec cette complexité et ces interactions pour dégrader complètement le matériau.

Concernant les relations structure-fonction des enzymes (point (d)), les questions sont essentiellement liées au caractère multi-modulaire des enzymes lignocellulolytiques. En effet, de nombreuses enzymes ont évoluées vers des structures modulaires qui présentent, en plus d'un module catalytique, un ou plusieurs module(s) non-catalytiques appelés CBM (carbohydrate binding module).[103] Les CBM ont une affinité forte pour un ou plusieurs des composés de la lignocellulose. Ils viennent ainsi aider l'enzyme à *trouver* son substrat et à le dégrader plus rapidement; notamment lorsqu'il s'agit d'un substrat insoluble et complexe (Fig.24B). Pour autant, les mécanismes d'action de ces CBM ne sont pas encore connus avec précision.[104–107]

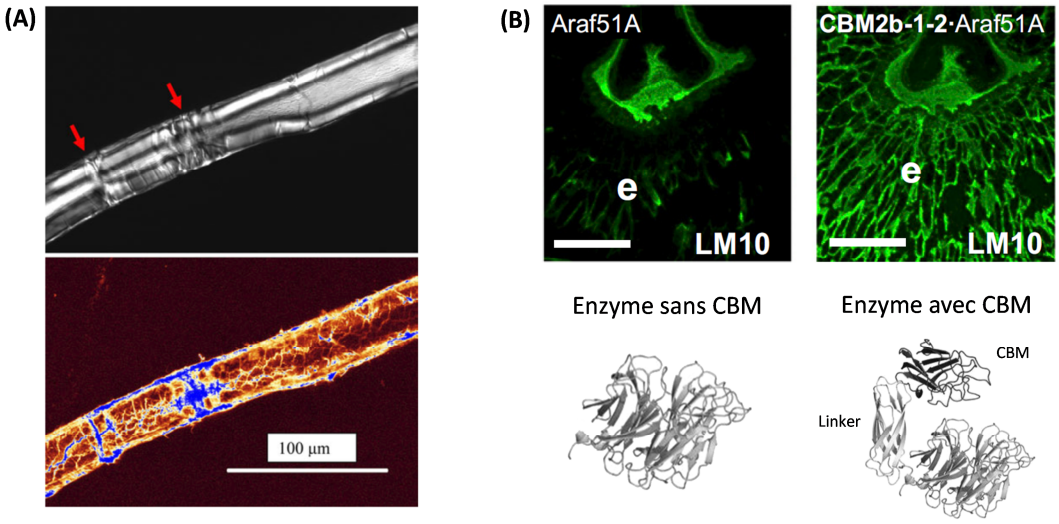

Fig.24. (A) Dégradation d'une fibre de cellulose par une endoglucanase, images de microscopie à lumière polarisée et microscopie confocale.[108] L'enzyme attaque la surface de la fibre et y pénètre par des points de fragilité structurale du matériau. (B) Dégradation d'une coupe de grain de blé par une arabinofuranosidase (Araf51A), images de microscopie à immunofluoresence, barre d'échelle 500 µm. Effet de la présence d'un CBM spécifique du xylane sur la quantité d'enzyme mise en œuvre lors de l'attaque.[106]

Dans ce contexte, les questions spécifiques qu'il faut aborder sont les suivantes :

Cinétiques enzymatiques

. A quelle vitesse se déroule la dégradation enzymatique en situation d'interface et/ou faible teneur en eau et fort confinement spatial ? Les paramètres cinétiques d'une enzyme diffèrent-ils d'une attaque mesurée en *bulk*, cad en solution simple et diluée où le substrat spécifique de l'enzyme est moléculaire et ne forme pas d'interface ? Comment expliquer ces différences ?

Interactions-propagation

. Comment interagissent les enzymes avec une surface ? Comment se propagent-elles au sein d'une structure lignocellulosique ? La dégradation se fait-elle de manière homogène ou hétérogène ? S'il existe des hétérogénéités d'attaque, en quoi sont-elles liées aux hétérogénéités de structure et/ou de composition du substrat ?

. Combien d'enzymes sont mises en jeu lors de l'attaque ? Ce nombre évolue-t-il lors de la dégradation et de la résultante restructuration du substrat avec le temps ? Les enzymes s'organisent-ils d'une façon particulière pour dégrader l'interface ? Les interactions enzymes-enzymes ont elles un rôle dans cette organisation ?

Relations structure-Fonction

. En quoi la présence d'un CBM vient-elle modifier le comportement d'une enzyme vis à vis des questions précédentes : cinétique, hétérogénéité de l'attaque, organisation spatiale ? Les enzymes possèdent-elles des propriétés intrinsèques spécifiques des caractères insoluble et confiné de leur substrat ?

3.2 Approche expérimentale et conceptuelle

Jusqu'à présent, les questions citées plus haut ont été abordées à travers les outils méthodologiques et conceptuels classiques de la biologie et de l'enzymologie ou en tout cas bien connus de ces communautés, comme la microscopie optique et le marquage spécifique d'enzymes et/ou composés de la biomasse par exemple.[106,109] Mais ma conviction est que les moyens d'observation mis en œuvre en (bio-)physique et physique de la matière molle se prêtent également particulièrement bien à ces questions. C'est ici tout l'objet des recherches que je mène et que je compte mener sur les 10 prochaines années.

L'idée principale est de parvenir à saisir l'enzyme *au travail*, cad à l'approche de son substrat, ou bien avec la macromolécule qu'il est en train de dégrader, ou bien à la fin de son action. Les moyens d'observation potentiels et disponibles dans la communauté des physiciens et physico-chimistes sont nombreux. Il peut s'agir de techniques de visualisation directe (AFM, tomographie X), de caractérisation indirecte (diffusion de rayonnement, réflectivité de neutrons), ou d'autres moyens de mesures de l'activité et de la mobilité d'une enzyme (SPR, QCM-D, mesures de diffusion); l'essentiel de ces techniques permettant d'obtenir des informations aux échelles mésoscopiques et nanométriques. Concernant les substrats à mettre en œuvre avec ces techniques, il est envisageable dans certains cas d'utiliser des matériaux bruts et naturels (paille de blé par ex.). Une autre manière d'aborder les choses - et c'est celle que je vais privilégier dans mes recherches - est de travailler sur des substrats modèles simplifiés (mono-, bi-, tri-constituants), et qui reproduisent une ou plusieurs caractéristique(s) du substrat réel : situation d'interface, confinement.

A l'international, peu de groupes ont encore tenté ou adopté ce type d'approche. Concernant les techniques de visualisation directe, il est cependant difficile de ne pas citer cette étude fino-japonaise qui montre la progression d'une enzyme cellulolytique sur un brin de cellulose par AFM à grande vitesse.[110] Des études sporadiques de groupes européens (Finlande, Suède) peuvent également être cités, notamment concernant des approches AFM ou des expériences préliminaires de diffusion de rayonnement aux petits angles.[111,112] Mais ce sont des groupes américains qui se sont le plus attelés à des observations de ce genre, avec en particulier celui de Michael S. Kent (Sandia National Laboratories),[113] et celui de Orlando Rojas (North Carolina State University).[114] Il s'agit dans tous les cas de groupes clairement étiquetés *biomasse* et de nature multidisciplinaire. Il semble que les laboratoires de physico-chimie et physique des colloïdes *généralistes* et réputés (Lund, Zurich, Harvard par ex.) ne se sont pas encore directement intéressés au couple enzyme-substrat.

A l'échelle nationale, et hors INRA, on note bien sûr les travaux du CERMAV à Grenoble, où des physico-chimistes (e.g. Bruno Jean, Jean-Luc Putaux) caractérisent et manipulent les parois végétales et leurs composés, sans toutefois s'intéresser directement aux phénomènes de dégradation enzymatique de ces parois.[115,116] Enfin au sein de l'INRA, c'est essentiellement le laboratoire BIA qui est coutumier des approches physico-chimiques comme la QCM-D, l'AFM, la réflectivité de neutrons, pour essentiellement la caractérisation de matériaux biosourcés, et, de façon récente et encore peu centrée sur les questions listées ci-dessus, pour la caractérisation de dégradations enzymatiques (Bernard Cathala et Céline Moreau, Estelle Bonin).[117–119] L'INRA de Reims engage également un tournant de ce côté depuis l'arrivée de Gabriel Paës et les techniques de mesures de diffusion d'enzymes par FRAP dans des matrices lignocellulosiques.[120,121]

Comme évoqué précédemment, l'approche que je privilégie dans mes recherches consiste à caractériser l'action enzymatique sur des *substrats modèles* et dans des conditions représentatives de la *réalité* du procédé : interface liquide-solide, fortes concentrations, complexité de composition. Je présente dans la suite les trois types de substrats modèles que j'ai choisi d'utiliser : **(i)** films minces, **(ii)** solutions semi-diluées, **(iii)** particules colloïdales. Avant ceci, je décris rapidement les polymères et les enzymes avec lesquels j'ai décidé de travailler en priorité.

Choix du substrat et de l'enzyme

Les recherches concernant la valorisation de la biomasse ont essentiellement focalisées sur la partie cellulosique de la biomasse (40% en masse). Ceci simplement parce que les débouchés du D-glucose, produit de dégradation de la cellulose, sont déjà très bien connus et qu'il existe de nombreux procédés de conversion du D-glucose en produits d'intérêt. La problématique de la dégradation et de la valorisation des hémicelluloses (jusqu'à 35% de la biomasse !) a beaucoup pâti de ce *gluco-centrisme*, alors même qu'il apparait économiquement et écologiquement nécessaire de trouver à utiliser cette matière première.[122] Les hémicelluloses sont des polymères de pentoses (essentiellement), avec une chaine principale généralement constituée de xyloses et des branchements arabinose, mannose, et glucose. Le D-xylose et le L-arabinose sont les produits principaux d'une déconstruction totale d'une hémicellulose, et il existe de nombreuses voies possibles de valorisation de ces composés : biofuels, conversion en ingrédients pour l'industrie alimentaire, la pharmacie (probiotiques), ou la chimie (surfactants).

Dans le cadre de mes recherches, l'idée est donc d'utiliser comme matière première une hémicellulose modèle, extraite d'une biomasse réelle et suffisamment pure pour des expériences reproductibles. Après discussion avec mes collègues de l'équipe c*atalyse et ingénierie enzymatique* du LISBP, mon choix s'est porté sur un arabinoxylane (AX) extrait du blé et commercialisé par Megazyme (P-WAXYL, pour *high purity wheat flour arabinoxylan of low viscosity*). Le polymère est constitué d'une chaine principale d'unités D-xylose reliées en β-(1→4) sur lesquelles viennent se greffer des unités L-arabinose sur les oxygènes positionnés en C2 et/ou C3 (Fig.25A).

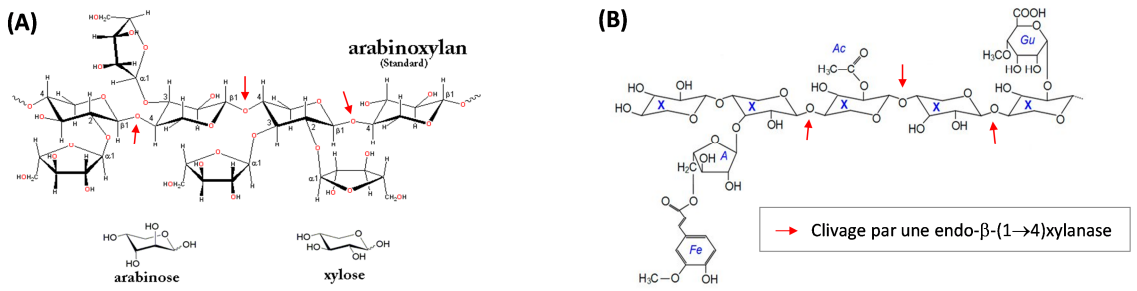

Fig.25. (A) Structure générique d'un arabinoxylane. (B) Certains substituts arabinose peuvent porter un acide férulique (Fe), un groupement acétyle (Ax), ou un acide méthyl glucuronique (Glu). Les flèches rouges indiquent les zones de clivage d'une endo-β-(1→4)xylanase.

La répartition des substitutions (type et nombre) sur la chaine de xylose est pseudo-aléatoire et peut varier d'une espèce végétale à l'autre. La solubilité du polymère dans l'eau dépend de sa taille et de son degré de substitution. Les AX les plus substitués sont les plus solubles dans l'eau, les substituts arabinose latéraux venant empêcher les chaines de xylane de s'associer les unes aux autres par formation de liaisons hydrogènes.[123] Le degré de substitution du P-WAXYL est de 0.6 (6 résidus arabinose pour 10 xyloses), lui assurant ainsi une très bonne solubilité dans l'eau. Dans la nature, et donc vraisemblablement avec le polymère que nous utilisons, certains substituts arabinose portent des fonctions féruliques, acétiques, et glucoroniques (Fig.25B). Seules les fonctions acide glucoronique portent une charge négative à des pH usuels (pKa ≈ 3.5). Elles sont peu nombreuses sur une même chaine et l'AX peut raisonnablement être considéré comme un polymère globalement non chargé. Des expériences SEC-MALS réalisées en 2014 sur ce polymère indiquent une polydispersité en taille assez importante avec une masse molaire en poids M_w = 400 kDa et en nombre M_n = 150 kDa. Son R_g moyen est de 57 nm.

Concernant les enzymes, il s'agit d'étudier principalement l'activité endo-β-(1→4)xylanase et donc le clivage de la chaine principale de l'AX entre deux monomères de xylose (flèche rouge sur la Fig.25). Cette fonction intéresse particulièrement mes collègues du LISBP (Cédric Montanier, Claire Dumon), et l'idée est que les approches que je développe puissent aider ces chercheurs à caractériser les enzymes qu'ils découvrent et étudient. En guise de *témoin*, nous utiliserons la xylanase NpXyn11A, enzyme connue et bien caractérisée dont il est possible de produire un mutant inactif.[102] Il est également possible, par des techniques maitrisées au LISBP de produire une NpXyn11A sur laquelle un CBM aura été greffé. Dans notre cas, un bon candidat est le CBM *CBM2b-1*, spécifique des arabinoxylanes.[124]

(i) Films minces

Dans ce premier cas, le substrat modèle est une interface plane constituée du polymère choisi, cad un film mince de ce matériau (10-100 nm). Le film est ensuite mis au contact d'une solution enzymatique et l'action de l'enzyme est suivie par différentes techniques d'analyse ex-situ ou in-situ : QCM-D pour la perte de masse et les propriétés viscoélastiques du film en cours de dégradation, ellipsométrie pour l'épaisseur de la couche, SPR, réflectivité X ou de neutrons pour la composition du film dans son épaisseur, microscopie AFM pour une vision directe de l'effet de l'enzyme sur la topographie de surface. Par ce type d'approche, la question de l'action enzymatique sur une interface solide est directement abordée.

Le principe d'un tel suivi n'est pas nouveau et des expériences de ce type, généralement fondées sur la technique QCM-D, ont été reportées par plusieurs groupes ces dernières années.[114,119,125,126] Cependant ces travaux se cantonnent presque exclusivement à l'étude de cellulases et de substrats cellulosiques; délaissant ainsi les substrats hémicellulosiques, les enzymes capables de les dégrader, et les spécificités de ces systèmes. Aussi le problème de la déconstruction enzymatique est systématiquement abordé de l'unique point de vue du substrat : les chercheurs utilisent une enzyme particulière (voire un cocktail d'enzymes commercial), modifient la structuration et/ou la composition du substrat, et regardent l'incidence de ces modifications sur les étapes de la déconstruction telles que caractérisées par QCM-D. Il semble cependant possible et prometteur de

compléter cette approche par l'utilisation d'enzymes produites par ingénierie enzymatique, aux propriétés modulées par mutation de certains acides aminés. Ceci permettrait d'aborder le problème dans toute sa dimension, et de répondre à des questions relevant tout autant du substrat que des relations structure-fonction des enzymes étudiées et/ou des séquences d'actions enzymatiques mises en jeu. Enfin rares sont les auteurs se risquant à confronter les signaux *bruts* issus d'une expérience QCM-D à des modèles physiques permettant de décrire l'évolution des propriétés du film au cours d'une dégradation enzymatique.[125] La modélisation des tracés QCM-D obtenus lors de la digestion enzymatique d'un film reste donc un véritable challenge. Elle est pourtant indispensable à la quantification précise des phénomènes mis en jeu : adsorption irréversible, *binding* (= association spécifique enzyme-substrat), et clivage enzymatique.

Plusieurs stratégies sont possibles pour préparer un film mince d'un AX sur une surface. La première et certainement la plus simple consiste à laisser s'adsorber spontanément le polymère sur une surface. Sur les surfaces d'or que constituent généralement les capteurs ou cristaux de QCM-D, la quantité d'AX adsorbée est de l'ordre du mg par m^2 quand le cristal est mis au contact d'une solution d'AX à ~1 g/L. Cette adsorption est irréversible et le film ne se redisperse pas par lavage avec de l'eau. On ne contrôle pas la structure du film dans ce cas et les chaines sont vraisemblablement adsorbées de façon aléatoire sur la surface. La Fig.26A montre le résultat d'expériences QCM-D de suivi de la dégradation d'un film d'AX produit de cette façon par trois enzymes que nous nommerons A, B et C. La perte de masse des films est normalisée par leur masse initiale m_i et portée en fonction du temps de contact avec la solution enzymatique.

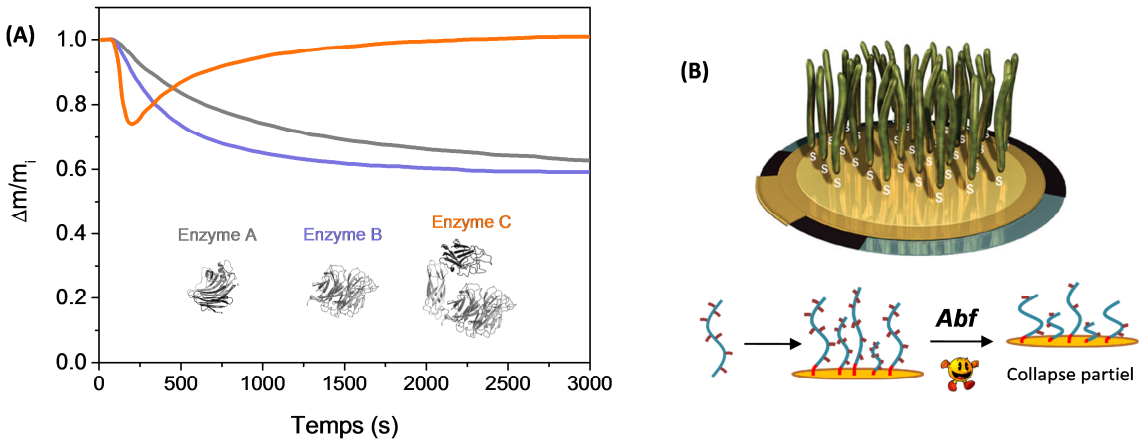

Fig.26. (A) Mesure QCM-D de la dégradation enzymatique d'un film d'AX préparé par adsorption simple. (B) Principe de formation d'une brosse d'AX par greffage sur une surface. Modulation de l'hydratation par traitement avec une arabinofuranosidase (Abf). Illustration tirée des travaux de Nordgren et al.[111]

Les paramètres cinétiques (≈ nombre de coupures par unité de temps pour une concentration donnée en enzyme) de ces trois enzymes vis à vis de l'AX ont été préalablement mesurés en *bulk*, cad dans une solution de cet AX. Les concentrations enzymatiques utilisées en QCM-D ont été ajustées de façon à ce que ces cinétiques soient parfaitement identiques pour les trois enzymes. Pourtant les

cinétiques observées sur la Fig.26A vis à vis de chaines d'AX adsorbées sur une surface sont clairement différentes. La perte de masse dans le film est plus rapide pour l'enzyme B que pour l'enzyme A, deux enzymes de composition et structure différentes. Ceci peut s'expliquer par (1) un nombre de coupures équivalent au même temps mais des fragments de chaines libérés de tailles différentes dans les deux cas, d'où des pertes de masse dissimilaires, (2) un nombre de coupure par unité de temps effectivement plus élevé pour l'enzyme B, suggérant que cet enzyme est plus adaptée à attaquer une interface que l'enzyme A (meilleure affinité pour un film ? meilleure propagation dans la structure du film ?). L'enzyme C est quant à elle identique à l'enzyme B mais possède un CBM spécifique des arabinoxylanes. Dans ce cas la perte de masse aux premiers instants est encore plus rapide que pour l'enzyme B. Après un certain temps, le film regagne ensuite de la masse, ce que nous expliquons par la forte affinité des enzymes avec CBM pour le film : à mesure que l'enzyme travaille, le film est dégradé jusqu'au point où il ne peut plus être déconstruit (60% de sa masse est insensible à l'enzyme, cf les résultats pour les enzymes A et B); le gain de masse du à l'affinité enzyme-substrat devient alors visible.

Les résultats ci-dessus sont très préliminaires, et il pourrait être intéressant de continuer à travailler avec ce type de films. Aussi nous pourrions compléter ces résultats par des mesures AFM ou d'ellipsométrie par exemple. Mais une difficulté réside dans l'interprétation des données et la modélisation des pertes de masse pour obtenir les véritables caractéristiques de l'action enzymatique : affinité enzyme-substrat, nombre de coupure par unité de temps. En particulier, il est probable que certains évènements enzymatiques de clivage ne soient pas répercutés sur la masse du film; si une chaine est attachée en plusieurs points à ces congénères ou à la surface d'or par exemple.

Pour qu'il y ait un lien direct entre clivage enzymatique et perte de masse, une possibilité est de faire un film constitué d'une *brosse* des chaines d'AX dans laquelle chaque brin est indépendant et attaché en un seul point à la surface du cristal QCM-D. Dans un article récent, Norgren et al. considèrent avoir réussi à préparer une brosse de ce type avec un polysaccharide à la composition proche d'un AX (xyloglucane).[111] Le polymère est modifié en bout de chaine par adjonction d'un thiosemicarbazide. Cette fonction soufrée permet aux chaines polymériques de se chimisorber par leur extrémité sur une surface d'or de façon irréversible, et de former ainsi un film de type brosse (Fig.26B). Nous avons exploré cette voie pendant plusieurs mois au LISBP, mais nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés qui nous ont peu à peu fait abandonner l'approche : dangerosité de la modification chimique de l'AX, purification des produits synthétisés, quantification des rendements, effet peu convaincant de la modification sur la masse du film en QCM-D. Mais je n'abandonne pas l'idée de la préparation d'une brosse d'AX par un moyen qui semble plus simple à mettre en œuvre et sans doute plus efficace. La technique m'est inspirée par de récents travaux du groupe d'Orlando Rojas.[127] Elle consiste dans un premier temps à oxyder l'AX en bout de chaine pour y introduire un groupe carboxyle. Il s'agit ensuite d'utiliser la *classique* chimie EDC/NHS pour greffer l'AX par son extrémité sur une monocouche d'alcanethiol auto-assemblée sur le cristal d'or et présentant des fonctions NH_2 en surface. Nous avons fait de premiers essais de manipulations et les résultats sont prometteurs. Si nous sommes capables de produire des *films brosses* d'AX de façon reproductible, une possibilité à moyen terme serait de jouer sur la teneur en eau dans les films par hydrolyse enzymatique partielle des résidus arabinoses sur les chaines de xylanes (Fig.26B). Nous utiliserons pour cela des arabinofuranosidases disponibles au LISBP. Cet *élagage* partiel de la chaine principale aura pour effet de rendre moins soluble le polymère et de le faire collapser en partie ou en totalité.

Avec les films ainsi préparés, nous aurons un moyen judicieux d'étudier l'effet du confinement du film sur l'action enzymatique d'une xylanase.

(ii) Solutions concentrées

De façon cette fois-ci à aborder la question de l'action enzymatique en milieu concentré, je propose de suivre l'action des enzymes sur des solutions d'AX préparées à différents degrés de confinement. Un premier type d'expérience consiste à disperser les enzymes de façon homogène dans des solutions elles-mêmes homogènes et préparées à différentes concentrations d'AX, du régime dilué ($C < C^*$) jusqu'aux régimes semidilué et concentré ($C > C^*$). L'action enzymatique est ensuite suivie sur différents plans :

. sur le plan de la cinétique simple de la réaction, par une détermination du nombre de coupures par unité de temps en utilisant des techniques colorimétriques type Nelson-Somogyi.[128]

. sur le plan de la nature des fragments relargués, par des mesures SEC-MALS de la distribution de taille de ces fragments.[129]

. sur le plan de la structure et de l'organisation dans l'espace des chaines de polymère et des enzymes, par des expériences de diffusion de rayonnement SAXS et/ou SANS.

. sur le plan de la dynamique et de la mobilité des chaines d'AX, par des techniques RMN (vitesse de relaxation $1/T_2$) ou de *laser speckle imaging* par exemple.[130]

. sur le plan des propriétés viscoélastiques des solutions par des mesures de rhéologie (viscosité et/ou modules visco-élastiques)

Tout l'intérêt est d'analyser l'effet de la concentration sur chacun de ces indicateurs, avec à la clé de nombreuses et - à mon sens - inédites informations sur l'action enzymatique en milieu confiné. On peut par exemple imaginer que dans des conditions de fortes concentrations, les enzymes ne soient que très peu mobiles et n'aient accès qu'aux chaines de substrat qui se trouvent à leur proximité immédiate. Dans ce cas la relation nombre de coupure / nature des fragments relargués pourrait être très différente de ce qui est mesuré en régime dilué, avec des fragments vraisemblablement plus petits en situation confinée. Aussi la présence de ces enzymes *coincées* dans le matériau pourrait engendrer la formation transitoire d'hétérogénéités de structure en son sein (= des zones où les chaines sont plus courtes et plus mobiles qu'alentour). Enfin il parait également possible d'observer des phénomènes de latence en milieu très concentré, avec un temps d'induction de l'action enzymatique pendant lequel l'enzyme travaille peu mais se libère petit à petit de son emprisonnement spatial pour finalement travailler plus facilement et plus rapidement.

Nous avons déjà quelque peu avancé sur ces approches, avec la préparation réussie de solutions d'AX par stress osmotique jusqu'à des concentrations pouvant atteindre 600 g/L, soit très largement au-dessus du C* pour ce polymère (2 g/L selon nos mesures de viscosité) et une situation où la distance entre brins de polymère est vraisemblablement similaire à la longueur de persistance de l'AX. Nous n'avons pas encore étudié de façon systématique l'action d'une enzyme sur ces dispersions. Mais nous avons cependant quelques premiers résultats intéressants de structure SANS obtenus courant 2016 sur la ligne D11 de l'ILL à Grenoble avec Ralf Schweins, responsable de la ligne, et Bernard Cabane. Je donne un aperçu de ces résultats sur la Fig.27 pour une concentration en AX de 40 g/L.

A faible vecteur d'onde *q* (région 1), l'intensité diffusée résulte de la présence probable de larges clusters ou amas de chaines d'AX faiblement hydratées.[131,132] Aux échelles intermédiaires (région 2), l'intensité provient de zones différentes de l'échantillon où les chaines d'AX sont en condition de bon solvant et forment un réseau enchevêtré (C > C*). La longueur de corrélation ξ du réseau (~60 Å), cad la taille approximative de la maille du réseau, est calculée à partir de modèles classiques pour ce type de système.[133] A grand *q* (région 3), le signal informe sur la conformation locale des chaines et l'intensité est décrite par un modèle WLC (*worm like chain*) pour des polymères semi-flexibles.

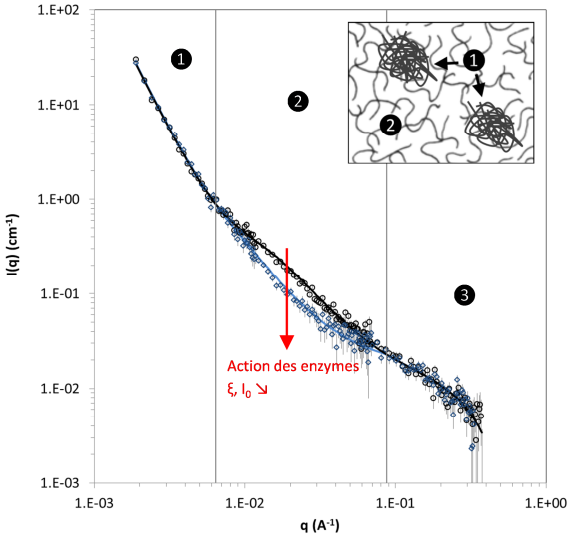

Fig.27. Structure SANS d'une solution semidiluée d'AX à 40 g/L avant (cercles noirs) et après (diamants bleus) action d'une endo-β-(1→4)xylanase à 10^{-5}M pendant 48 h. Les lignes pleines sont le résultat d'une modélisation qui tient compte de la présence d'amas denses d'AX (1) séparés par des chaines d'AX en bon solvant (2).

Après 24 h de l'action de l'enzyme, le profil SANS ne change pas dans les régions 1 et 3. Il est par contre clairement affecté aux échelles intermédiaires avec une diminution de l'intensité diffusée et de la longueur de corrélation ξ obtenue par le fit (de ~60 Å à ~25 Å). Deux scenarios peuvent expliquer cette diminution du ξ :

(1) Les enzymes attaquent préférentiellement les clusters d'AX faiblement hydratés. Cela n'a pas d'effet direct à petit *q* car les clusters ne changent pas foncièrement de taille ni de nombre. Cependant la dégradation des clusters vient libérer des chaines longues dans les régions hydratées de l'échantillon, venant ainsi augmenter l'enchevêtrement des chaines dans ces zones et diminuer ξ.

(2) Les enzymes travaillent préférentiellement dans les zones hydratées de l'échantillon et la dégradation est si efficace que des chaines plus petites que la maille du réseau sont produites, faisant ainsi diminuer la longueur de corrélation moyenne ξ.

Il s'agit maintenant d'aller au-delà de ces premiers résultats et de discriminer ces deux scénarios par une étude SANS plus systématique (un proposal a été déposé en ce sens) et les expériences complémentaires décrites plus haut : cinétique, SEC-MALS, dynamique.

J'envisage de réaliser un second type d'expérience utilisant des solutions semi-diluées et concentrées d'AX, dans le but cette fois de suivre la propagation et la migration des enzymes dans le matériau (cf Fig.28).

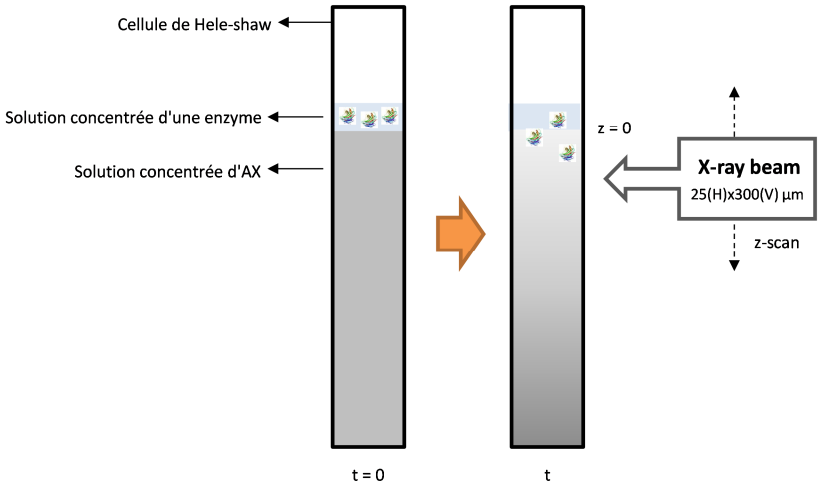

Fig.28. Principe du suivi SAXS d'un front de dégradation enzymatique dans une solution semidiluée d'AX. Un proposal a été déposé début 2017 sur le synchrotron Soleil.

Jusqu'à présent, les études portant sur la mobilité des enzymes dans des structures lignocellulosiques se limitent à des mesures de *self-diffusion* (cad en dehors de tout gradient en concentration des enzymes) d'enzymes inactives ou de traceurs inertes, qui ne modifient en rien la structure ou les propriétés du medium quand ils y progressent.[121] Au contraire les expériences que je propose visent à caractériser le comportement d'enzymes *actives*, dans un fort gradient de concentration en enzyme. Brièvement, l'idée est de déposer un petite volume de solution enzymatique à la surface d'une dispersion concentrée d'AX disposée dans une cellule de type Hele-Shaw (Fig.28). Des spectres SAXS de la dispersion, pris à différents temps et différentes distances à partir du point d'entrée des enzymes (z = 0), nous donnerons des indications quant aux changements de structure dans la solution d'AX (e.g. longueur de corrélation, cf Fig. 27). Parallèlement, des expériences de microscopie à fluorescence, réalisées dans les mêmes conditions mais avec des enzymes rendues fluorescentes, permettront de suivre l'évolution du gradient en concentration d'enzyme dans la direction z en fonction du temps. L'objectif est de pouvoir comparer les deux gradients : concentration en enzymes, longueurs caractéristiques du polymère, de façon à caractériser précisément le déroulement de la dégradation. On peut également imaginer d'employer la technique de *laser speckle imaging* pour suivre le changement de dynamique des chaines dans cette configuration;[130] changement qui devraient être clairement visible à mesure que des chaines plus petites et plus mobiles sont créées lors de la progression des enzymes.

(iii) Particules colloïdales

Un moyen de reproduire une situation d'interface et/ou de très forts gradients en substrat est de confronter les enzymes à des particules de lignocellulose. Un choix véritablement stratégique

concerne la taille des particules à utiliser. Une possibilité est de rester dans les conditions du procédé et donc d'utiliser des particules millimétriques ou microniques issues du broyage d'un substrat naturel. Avec de telles particules macroscopiques, les techniques directes de suivi de l'action enzymatique (microscopie électronique, X, ou de fluorescence notamment) offrent des possibilités intéressantes. Elles ne donnent toutefois aucune indication sur le comportement individuel ou collectif des enzymes à leur échelle (nanométrique). La seconde possibilité est donc d'utiliser des particules de tailles voisines de celles des enzymes (50-200 nm max), de façon à ce que l'action individuelle d'une enzyme - un évènement catalytique ou la simple adhésion de l'enzyme au substrat - engendre une modification détectable des propriétés de la particule : taille, structure, propriétés de l'interface, homogénéité de composition (Fig.29).

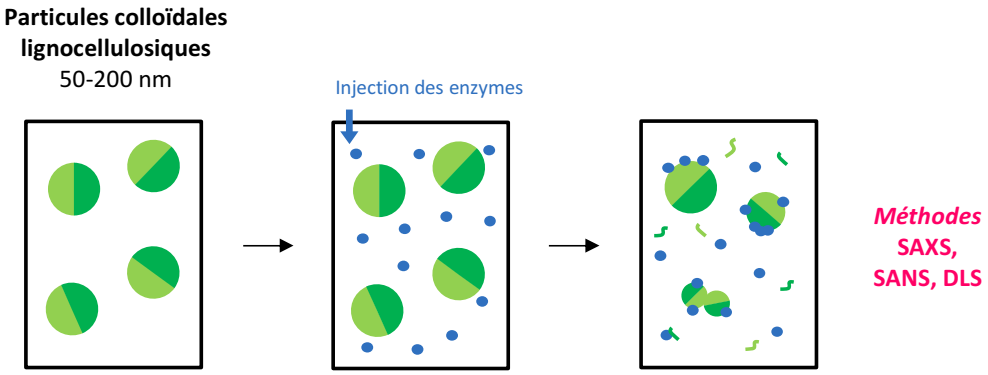

Fig.29. Suivi des interactions enzyme-substrat et de la dégradation enzymatique en utilisant des particules colloïdales de lignocellulose.

Les particules colloïdales doivent être représentatives de la composition de la biomasse lignocellulosique et des différentes interactions entre les composants de cette biomasse. Je vois deux voies potentielles d'obtention de telles particules : (1) les synthétiser à partir de certains des composant majoritaires de la biomasse (cellulose, hémicellulose, lignine), (2) fragmenter et broyer un substrat naturel jusqu'aux échelles colloïdales. Dans tous les cas, l'idée est bien sûr d'avoir des particules aux propriétés bien caractérisées voire contrôlées. Il serait également intéressant de produire des particules de complexité variable en termes de composition; ce qui est envisageable à travers la voie d'obtention (1).

Concernant la synthèse de particules lignocellulosiques colloïdales, une possibilité est de s'inspirer de travaux initiés à l'INRA de Reims et Nantes à travers la thèse d'Abdelatif Barakat notamment.[134–136] Un monomère de la lignine (alcool coniférylique) est polymérisé en présence d'une hémicellulose. Il en résulte des colloïdes de taille 10-100 nm, vraisemblablement de nature *core-shell*, avec un cœur de lignine et une couronne moins dense de xylane. Ce sont des colloïdes mous et déformables, de densité interne plutôt faible (150 g/L) mais ajustable à la hausse. Le xylane interagit avec la lignine via des interactions hydrophobes mais des liaisons covalentes lignine-xylane sont également formées lors de la synthèse. Selon les auteurs, les suspensions de ces particules sont stables sur des périodes longues (mois). Nous avons fait dernièrement de tout premiers essais de synthèse de particules AX-

alcool coniférylique en suivant les protocoles de nos collègues. Les particules obtenues sont un peu plus grosses qu'attendu (100-200 nm), mais restent de taille colloïdale.

Concernant la possibilité de fractionner une biomasse naturelle jusqu'aux échelles colloïdales, l'idée parait simple et elle a l'avantage de conserver la complexité structurale et compositionnelle de la biomasse et de maintenir les interactions *natives* entre ses différents constituants. Mais la mise en œuvre d'un tel broyage parait compliquée et il n'existe à ma connaissance aucun exemple dans la littérature. Dans le cas d'une biomasse *brute*, le danger pourrait être la possible ré-agglomération des particules fines en cours de broyage, ce qui empêcherait d'atteindre des tailles colloïdales. A contrario, le relargage de composés amphiphiles en cours de broyage pourrait également stabiliser les particules fines. On pourrait aussi imaginer de modifier le pH ou d'autres conditions physico-chimiques en cours de broyage pour limiter cette ré-agglomération. Il s'agit dans tous les cas d'un travail de longue haleine et je ne compte pas essayer cette voie d'obtention des particules dans un premier temps. J'ai cependant commencé de me rapprocher de collègues INRA (Abdellatif Barakat, Montpellier) et CNRS (Christine Frances, LGC) pour discuter de la faisabilité de l'opération et faire de premiers essais dans les années à venir.

Une fois les particules colloïdales synthétisées, l'objectif est de suivre le déroulement de leur dégradation par des enzymes aux propriétés contrôlées. Les grandeurs pertinentes sont :

. nombre, taille, polydispersité des particules après contact avec l'enzyme active (dégradation) ou l'enzyme inactive (adsorption)

. degré de dissociation, nombre et taille de chaines relarguées lors de l'attaque

. variation des propriétés de l'interface (rugosité) et/ou de la structure interne des particules (inhomogénéités)

. organisation des particules dans la solution lors du traitement enzymatique : interactions, agrégation, séparation de phase

Les techniques à privilégier pour réaliser un tel suivi sont celles utilisées classiquement en physique des colloïdes : diffusion de rayonnement (SAXS/SANS), DLS, turbidité, imagerie AFM & SEM, rhéologie et pression osmotique des dispersions.

Concernant les techniques de diffusion de rayonnement, SAXS et SANS peuvent caractériser les particules avant et en cours de dégradation, et en particulier caractériser la nature de l'interface particule / solution : cette interface est-elle lisse, de nature fractale, ou de type brush/buissonneuse ? quelle est la surface spécifique ? De même, SAXS et SANS sont un moyen d'accéder à la structure globale des objets et à l'évolution de cette structure avec la dégradation : tailles, polydispersité, rayons de giration, inhomogénéité de composition. Les interactions enzymes-particules peuvent aussi être étudiée spécifiquement par SAXS/SANS. Avec un enzyme inactive, on pourrait ainsi quantifier l'adsorption enzyme-particule en fonction de la concentration en enzyme, de façon à voir s'il existe des régimes *pauvres* et *riches* en enzymes.

Les techniques de microscopie haute résolution de type SEM et AFM peuvent aussi apporter des informations qualitatives intéressantes de type morphologique sur le déroulement de la dégradation. On peut aussi imaginer obtenir des informations plus quantitatives via l'AFM en mesurant le module viscoélastique des particules en cour de déconstruction par exemple. Enfin on peut envisager de suivre la dégradation de façon moins directe - mais tout aussi intéressante - par l'intermédiaire de

grandeurs physiques comme les propriétés rhéologiques ou osmotiques des suspensions. La viscosité des suspensions colloïdales, ou leur viscoélasticité dans le cas de suspensions concentrées, renseignent sur les interactions et la structuration des objets en présence. La pression osmotique est quant à elle extrêmement sensible au nombre d'objets en présence et à leur interactions. Suivre ces grandeur, en cours de dégradation, pourrait être utile et très complémentaire des techniques de caractérisation directe citées plus haut.

[Substrat naturel brut / Immobilisation d'enzymes sur des surfaces

De façon moins personnelle (je ne suis pas l'instigateur des travaux), je suis impliqué depuis peu dans un projet porté par Cédric Montanier et visant à suivre la dégradation enzymatique de coupes de paille de blé par combinaison de techniques d'imagerie à différentes échelles : tomographie X et AFM. Mes perspectives de recherche englobent bien sûr ce travail, même s'il dépasse le cadre stricte des approches présentées ci-dessus sur des systèmes modèles de structure et composition bien moins complexe. Enfin toujours en marge de mes activités principales au LISBP, je participe avec Cédric Montanier à l'analyse et à l'interprétation de résultats que ce dernier a obtenus concernant l'immobilisation d'enzymes lignocellulolytiques à la surface de billes microniques et sur l'activité enzymatique des objets ainsi construits (article AP5).**]**

3.3 Moyens

Pour m'aider au déploiement des perspectives de recherche que je viens de présenter, je dispose du franc soutien de l'INRA et du département CEPIA à travers un projet ANS à mon arrivée au LISBP (2013-2015) et surtout la bourse de thèse INRA-Région de Lucie Dianteill (2016-2019, cf partie 1.3). Je n'ai pour l'instant pas obtenu d'autre soutien financier par mes propres moyens, et il faudra bien sûr que je m'attelle au dépôt de projets type ANR et autre (j'ai déposé un projet ANR JCJC en octobre 2015, non retenu). Mon équipe d'accueil - TIM - s'est engagée à soutenir mes activités pour les 2-3 prochaines années en pourvoyant aux frais de fonctionnement de la thèse que j'encadre.

Du point de vue des techniques expérimentales, le LISBP, et notamment l'équipe *catalyse et ingénierie enzymatique* avec qui je collabore directement, dispose de tous les équipements nécessaires pour la production des enzymes, leur purification et leur caractérisation biochimique. Les techniques de caractérisation physique que j'utilise et compte utiliser dans la suite sont par contre très peu représentées au LISBP. Mais la plupart de ces techniques sont disponibles sur Toulouse dans des laboratoires que je connais bien ou desquels je me suis fait connaitre ces 2-3 dernières années. Je pense notamment à l'ITAV pour les équipements AFM et QCM-D, le CIRIMAT pour l'ellipsométrie, ou encore le LGC pour son équipement SAXS récent et particulièrement performant. A ce titre, l'existence de la fédération FERMaT sur le site toulousain est un atout majeur car la fédération permet à la fois d'apporter les fonds pour l'achat de gros instruments et de mettre en relation des chercheurs de différents horizons de façon à partager les savoirs et compétences techniques de chacun.

Enfin dans les années à venir, il me semble important de faire connaître mon travail aux industriels travaillant sur la valorisation de la biomasse. Mon expérience est que ce type de dialogue met un certain temps à s'établir, et que c'est généralement à partir de résultats scientifiques existants que des discussions peuvent naître (c'est ce qui s'est passé à Rennes avec des contacts avec BBA et la société Bel par exemple). Un moyen d'approcher les industriels du secteur est sans doute d'utiliser la structure TWB présente sur Toulouse. Une idée, qui pourrait se concrétiser à moyen ou long terme, serait de proposer aux industriels de TWB un projet inter-équipe, qui s'attèle à un travail multi-échelle et multidisciplinaire (ingénierie enzymatique, (bio-)physique, génie des procédés) sur un procédé en particulier; à l'image de ce que j'ai pu faire à Rennes sur la filtration du lait.

4 Conclusion

Voici maintenant un peu plus de 10 ans que je suis chercheur INRA; une période riche et marquée par un changement radical de thématique de recherche à mon intégration au LISBP récemment. C'est avec constance et je pense cohérence que j'ai abordé et continue d'aborder les questions qui m'ont été confiées ou que j'ai choisi de traiter. Cette cohérence scientifique est à l'origine du titre de ce mémoire. Elle découle de mon (intacte) conviction que nous avons *toujours* tout à gagner à caractériser, aux *échelles intermédiaires* (nm → µm) et par des moyens *physiques*, les mécanismes mis en œuvre dans un procédé de transformation pour mieux le comprendre et l'optimiser. L'approche n'est de fait pas classique dans le domaine du génie de procédés. Mais elle n'en n'est pas pour autant marginale et elle se développe dans de nombreux groupes de recherche internationaux et nationaux (en témoigne le succès du GdR AMC2 pour la France).

A ma première affectation au STLO de Rennes, j'ai sciemment décidé d'aborder la problématique qui m'était confiée par ce type d'approche. Pour étudier la filtration du lait, je suis en quelque sorte *sorti* du procédé - ce qui n'avait pour ainsi dire jamais été fait dans le domaine - pour m'intéresser spécifiquement aux interactions entre micelles de caséine aux fortes concentrations, à l'organisation des objets dans les dispersions, et à l'impact des interactions et de la structure sur les propriétés rhéologiques et diffusionnelles des systèmes concentrés. Mes collègues et moi-même avons ensuite démontré que les données recueillies étaient pour le moins éclairantes sur le déroulement d'une filtration, et qu'elles pouvaient être utilisées pour modéliser et prédire la filtration frontale d'un lait. Les perspectives de ces travaux sont nombreuses mais ne m'impliquent plus directement maintenant. Elles concernent notamment la meilleure compréhension des mécanismes d'adhésion entre micelles de caséine et la modélisation de la filtration en mode tangentiel.

Au cours de mes dernières années à Rennes et pendant cette période césure que j'ai vécue au LGC avant mon affectation au LISBP, j'ai impulsé à mes travaux un mouvement à la fois de diversification et de généralisation : diversification à travers des travaux sur la structure de la micelle de caséine ou les interactions entre protéines globulaires aux fortes concentrations, généralisation par une étude - encore en cours - du comportement d'objets modèles déformables et compressibles en filtration et compression. Dans tous les cas, je conservais et conserve ce tropisme vers une caractérisation fondée sur des concepts et outils de la physico-chimie et de la physique de la matière molle. C'est au moment où j'entamais ces différents travaux que des collègues INRA et moi-même avons réalisé que nous partagions cette inclinaison pour des approches *soft matter*. Nous sommes à présent en train de publier un article qui revient sur les différentes thématiques INRA abordées par ce prisme (article AS1). Avec les mêmes personnes, nous travaillons actuellement sur une *review* plus exhaustive concernant l'application des concepts de la matière molle aux *food sciences* (article AP2).

Le virage que j'ai entrepris à mon arrivée au LISBP est important - il y a en effet peu de point commun entre la filtration du lait et la déconstruction enzymatique de la biomasse - mais il s'agit d'un virage thématique uniquement. Concernant la démarche, je persiste et envisage encore de suivre les processus mis en jeu dans le procédé de déconstruction par des expériences physiques réalisées dans des situations modèles, sur des objets modèles, et aux petites échelles. Il s'agit à présent de convaincre mes collègues directs, le laboratoire, et le reste de la communauté scientifique que cette orientation est pertinente.

5 Références

1. Kim, Y. H. & Moon, S.-H. Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electrodialysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76,** 169–178 (2001).

2. Kunz, W., Henle, J. & Ninham, B. W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9,** 19–37 (2004).

3. Bargeman, G., Vollenbroek, J. M., Straatsma, J., Schroën, C. G. P. H. & Boom, R. M. Nanofiltration of multi-component feeds. Interactions between neutral and charged components and their effect on retention. *J. Membr. Sci.* **247,** 11–20 (2005).

4. Escoda, A., Fievet, P., Lakard, S., Szymczyk, A. & Déon, S. Influence of salts on the rejection of polyethyleneglycol by an NF organic membrane: Pore swelling and salting-out effects. *J. Membr. Sci.* **347,** 174–182 (2010).

5. Nilsson, M., Trägårdh, G. & Östergren, K. The influence of pH, salt and temperature on nanofiltration performance. *J. Membr. Sci.* **312,** 97–106 (2008).

6. Luo, J. & Wan, Y. Effects of pH and salt on nanofiltration—a critical review. *J. Membr. Sci.* **438,** 18–28 (2013).

7. Galier, S. & Roux-de Balmann, H. The electrophoretic membrane contactor: A mass-transfer-based methodology applied to the separation of whey proteins. *Sep. Purif. Technol.* **77,** 237–244 (2011).

8. Fuoco, A., Galier, S., Roux-de Balmann, H. & De Luca, G. Correlation between macroscopic sugar transfer and nanoscale interactions in cation exchange membranes. *J. Membr. Sci.* **493,** 311–320 (2015).

9. Umpuch, C., Galier, S., Kanchanatawee, S. & Balmann, H. R. Nanofiltration as a purification step in production process of organic acids: Selectivity improvement by addition of an inorganic salt. *Process Biochem.* **45,** 1763–1768 (2010).

10. Belfort, G., Davis, R. H. & Zydney, A. L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **96,** 1–58 (1994).

11. Rout, M. P. *et al.* The Yeast Nuclear Pore Complex. *J. Cell Biol.* **148,** 635–652 (2000).

12. Raveh, B. *et al.* Slide-and-exchange mechanism for rapid and selective transport through the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113,** E2489–E2497 (2016).

13. Ducker, W. A., Senden, T. J. & Pashley, R. M. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature* **353,** 239–241 (1991).

14. James, B. J., Jing, Y. & Dong Chen, X. Membrane fouling during filtration of milk—a microstructural study. *J. Food Eng.* **60,** 431–437 (2003).

15. Brans, G., Schroen, C. G. P. H., Van Der Sman, R. G. M. & Boom, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Membr. Sci.* **243,** 263–272 (2004).

16. Gésan-Guiziou, G., Boyaval, E. & Daufin, G. Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. *J. Membr. Sci.* **158,** 211–222 (1999).

17. Jimenez-Lopez, A. J. E. *et al.* Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skimmilk microfiltration (0.1µm). *Sep. Purif. Technol.* **61,** 33–43 (2008).

18. Rabiller-Baudry, M., Gesan-Guiziou, G., Roldan-Calbo, D., Beaulieu, S. & Michel, F. Limiting flux in skimmed milk ultrafiltration: impact of electrostatic repulsion due to casein micelles. *Desalination* **175,** 49–59 (2005).

19. Bowen, W. R. & Williams, P. M. Quantitative predictive modelling of ultrafiltration processes: Colloidal science approaches. *AdvColloid Interface Sci* **134–135,** 3–14 (2007).

20. Elimelech, M. & Bhattacharjee, S. A novel approach for modeling concentration polarization in crossflow membrane filtration based on the equivalence of osmotic pressure model and filtration theory. *J. Membr. Sci.* **145,** 223–241 (1998).

21. Bacchin, P., Meireles, M. & Aimar, P. Modelling of filtration: from the polarised layer to deposit formation and compaction. *Desalination* **145,** 139–146 (2002).

22. Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J.-J. & Pezennec, S. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J. Colloid Interface Sci.* **315,** 627–636 (2007).

23. Croguennec, T., Renault, A., Bouhallab, S. & Pezennec, S. Interfacial and foaming properties of sulfydryl-modified bovine β-lactoglobulin. *J. Colloid Interface Sci.* **302,** 32–39 (2006).

24. Pignon, F. *et al.* Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process. *J. Chem. Phys.* **121,** 8138–8146 (2004).

25. David, C. *et al.* Spatial and Temporal in Situ Evolution of the Concentration Profile during Casein Micelle Ultrafiltration Probed by Small-Angle X-ray Scattering. *Langmuir* **24,** 4523–4529 (2008).

26. Alexander, M., Rojas-Ochoa, L. F., Leser, M. & Schurtenberger, P. Structure, dynamics, and optical properties of concentrated milk suspensions: an analogy to hard-sphere liquids. *J. Colloid Interface Sci.* **253,** 35–46 (2002).

27. Stradner, A. *et al.* Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* **432,** 492–495 (2004).

28. Mezzenga, R., Schurtenberger, P., Burbidge, A. & Michel, M. Understanding foods as soft materials. *Nat Mater* **4,** 729–740 (2005).

29. Clermont, Y., Xia, L., Rambourg, A., Tuner, J. D. & Hermo, L. Transport of Casein Submicelles and Formation of Secretion Granules in the Golgi Apparatus of Epithelial Cells of the Lactating Mammary Gland of the Rat. *Anat. Rec.* **235,** 363–373 (1993).

30. De Kruif, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* **81,** 3019–3028 (1998).

31. Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A. & Goff, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* **14,** 1025–1031 (2004).

32. Dalgleish, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter* **7,** 2265–2272 (2011).

33. De Kruif, C. G. Casein micelle interactions. *Int. Dairy J.* **9,** 183–188 (1999).

34. Tuinier, R. & De Kruif, C. G. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* **117,** 1290–1295 (2002).

35. De Kruif, C. G. & Zhulina, E. B. k-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **117,** 151–159 (1996).

36. Moitzi, C., Menzel, A., Schurtenberger, P. & Stradner, A. The pH Induced Sol-Gel Transition in Skim Milk Revisited. A Detailed Study Using Time-Resolved Light and X-ray Scattering Experiments. *Langmuir* **27,** 2195–2203 (2011).

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

38. Holt, C., De Kruif, C. G., Tuinier, R. & Timmins, P. A. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **213,** 275–284 (2003).

39. Horne, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11,** 148–153 (2006).

40. Dalgleish, D. G. The casein micelle and its reactivity. *Lait* **87,** 385–387 (2007).

41. Holt, C. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* **43,** 63–151 (1992).

42. Walstra, P. Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* **9,** 189–192 (1999).

43. Horne, D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* **8,** 171–177 (1998).

44. Chang, J. *et al.* Structural and Thermodynamic Properties of Charged Silica Dispersions. *J. Phys. Chem.* **99,** 15993–16001 (1995).

45. Parsegian, V. A., Fuller, N. & Rand, R. P. Measured Work of Deformation and Repulsion of Lecithin Bilayers. *Proceeding Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 2750–2754 (1979).

46. Torquato, S. & Stillinger, F. H. Jammed hard-particle packings: From Kepler to Bernal and beyond. *Rev. Mod. Phys.* **82,** 2633–2672 (2010).

47. Senff, H. & Richtering, W. Temperature sensitive microgel suspensions: Colloidal phase behavior and rheology of soft spheres. *J. Chem. Phys.* **111,** 1705–1711 (1999).

48. Cloitre, M., Borrega, R., Monti, F. & Leibler, L. Structure and flow of polyelectrolyte microgels: from suspensions to glasses. *Comptes Rendus Phys.* **4,** 221–230 (2003).

49. Menut, P., Seiffert, S., Sprakel, J. & Weitz, D. A. Does size matter? Elasticity of compressed suspensions of colloidal- and granular-scale microgels. *Soft Matter* **8,** 156–164 (2012).

50. Schaertl, W. & Sillescu, H. Brownian dynamics of polydisperse colloidal hard spheres: Equilibrium structures and random close packings. *J. Stat. Phys.* **77,** 1007–1025 (1994).

51. Mason, T. G., Bibette, J. & Weitz, D. A. Elasticity of Compressed Emulsions. *Phys. Rev. Lett.* **75,** 2051–2054 (1995).

52. Mason, T. G. *et al.* Osmotic pressure and viscoelastic shear moduli of concentrated emulsions. *Phys. Rev. E* **56,** 3150–3166 (1997).

53. Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P. & Howe, A. M. Physical Gelation of Gelatin Studied with Rheo-Optics. *Macromolecules* **36,** 10009–10020 (2003).

54. Dupont, D. *et al.* Topography of the Casein Micelle Surface by Surface Plasmon Resonance (SPR) Using a Selection of Specific Monoclonal Antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **59,** 8375–8384 (2011).

55. Kumosinski, T. F., Pessen, H., Farrell, H. M. & Brumberger, H. Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-ray scattering: Submicellar and micellar forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **266,** 548–561 (1988).

56. De Kruif, C. G., Tuinier, R., Holt, C., Timmins, P. A. & Rollema, H. S. Physicochemical Study of k and b-Casein Dispersions and the Effect of Cross-Linking by Transglutaminase. *Langmuir* **18,** 4885–4891 (2002).

57. Shukla, A., Narayanan, T. & Zanchi, D. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter* **5,** 2884–2888 (2009).

58. Marchin, S., Putaux, J. L., Pignon, F. & Léonil, J. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering/ultrasmall-angle X-ray scattering. *J. Chem. Phys.* **126,** 045101–045110 (2007).

59. Mezzenga, R. & Fischer, P. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Rep. Prog. Phys.* **76,** 46601 (2013).

60. Holt, C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *Int. Dairy J.* **60,** 2–13 (2016).

61. Ingham, B. *et al.* Solving the mystery of the internal structure of casein micelles. *Soft Matter* **11,** 2723–2725 (2015).

62. Ingham, B. *et al.* Revisiting the interpretation of casein micelle SAXS data. *Soft Matter* **12,** 6937–6953 (2016).

63. De Kruif, C. G. The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *J. Appl. Crystallogr.* **47,** 1479–1489 (2014).

64. Auvray, L., Cotton, J. P., Ober, R. & Taupin, C. Concentrated Winsor microemulsions : a small angle X-ray scattering study. *J.Phys.France* **45,** 913–928 (1984).

65. Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J. & Harte, F. Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* **94,** 5770–5775 (2011).

66. HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L. & Moulai-Mostefa, N. Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocoll.* **22,** 1460–1466 (2008).

67. Wang, J. H. Theory of the Self-diffusion of Water in Protein Solutions. A New Method for Studying the Hydration and Shape of Protein Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **76,** 4755–4763 (1954).

68. Wang, J. H., Anfinsen, C. B. & Polestra, F. M. The Self-diffusion Coefficients of Water and Ovalbumin in Aqueous Ovalbumin Solutions at 10°C. *J. Am. Chem. Soc.* **76,** 4763–4765 (1954).

69. Jönsson, B., Wennerström, H., Nilsson, P. G. & Linse, P. Self-diffusion of small molecules in colloidal systems. *Colloid Polym. Sci.* **264,** 77–88 (1986).

70. Bessière, Y., Abidine, N. & Bacchin, P. Low fouling conditions in dead-end filtration: Evidence for a critical filtered volume and interpretation using critical osmotic pressure. *J. Membr. Sci.* **264,** 37–47 (2005).

71. Happel, J. Viscous flow in multiparticle systems: Slow motion of fluids relative to beds of spherical particles. *AIChE J.* **4,** 197–201 (1958).

72. Abade, G. C., Cichocki, B., Ekiel-Jezewska, M. L., Nagele, G. & Wajnryb, E. Dynamics of permeable particles in concentrated suspensions. *Phys. Rev. E* **81,** 20404 (2010).

73. Uricanu, V. I., Duits, M. H. G. & Mellema, J. Hierarchical Networks of Casein Proteins: An Elasticity Study Based on Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **20,** 5079–5090 (2004).

74. Helstad, K., Rayner, M., van Vliet, T., Paulsson, M. & Dejmek, P. Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nanoindentation with AFM. *Food Hydrocoll.* **21,** 726–738 (2007).

75. Stuhrmann, H. Neutron small-angle scattering of biological macromolecules in solution. *J. Appl. Crystallogr.* **7,** 173–178 (1974).

76. Stuhrmann, H. B. & Duee, E. D. The determination of the scattering density distribution of polydisperse solutions by contrast variation: a neutron scattering study of ferritin. *J. Appl. Crystallogr.* **8,** 538–542 (1975).

77. de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V. Casein micelles and their internal structure. *AdvColloid Interface Sci* **171–172,** 36–52 (2012).

78. Grey, M. *et al.* Acceleration of α-Synuclein Aggregation by Exosomes. *J. Biol. Chem.* **290,** 2969–2982 (2015).

79. Stradner, A., Cardinaux, F. & Schurtenberger, P. A Small-Angle Scattering Study on Equilibrium Clusters in Lysozyme Solutions. *J. Phys. Chem. B* **110,** 21222–21231 (2006).

80. Shukla, A. *et al.* Absence of equilibrium cluster phase in concentrated lysozyme solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105,** 5075–5080 (2008).

81. Nir, O., Trieu, T., Bannwarth, S. & Wessling, M. Microfiltration of deformable microgels. *Soft Matter* **12,** 6512–6517 (2016).

82. Hwang, K. J., Wang, Y. T., Iritani, E. & Katagiri, N. Effect of gel particle softness on the performance of cross-flow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **365,** 130–137 (2010).

83. Linkhorst, J., Beckmann, T., Go, D., Kuehne, A. J. C. & Wessling, M. Microfluidic colloid filtration. *Sci. Rep.* **6,** 22376 (2016).

84. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., van Bommel, E. M. G., Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres. *Int. J. Pharm.* **183,** 29–32 (1999).

85. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., Bommel, E. M. G. van, Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. The Preparation of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics. *Pharm. Res.* **15,** 557–561 (1998).

86. Agbangla, G. C., Climent, É. & Bacchin, P. Experimental investigation of pore clogging by microparticles: Evidence for a critical flux density of particle yielding arches and deposits. *Sep. Purif. Technol.* **101,** 42–48 (2012).

87. Bacchin, P., Marty, A., Duru, P., Meireles, M. & Aimar, P. Colloidal surface interactions and membrane fouling: Investigations at pore scale. *Adv. Colloid Interface Sci.* **164,** 2–11 (2011).

88. Laar, T. van de, Klooster, S. ten, Schroën, K. & Sprakel, J. Transition-state theory predicts clogging at the microscale. *Sci. Rep.* **6,** 28450 (2016).

89. Krebs, T., Schroën, K. & Boom, R. Coalescence dynamics of surfactant-stabilized emulsions studied with microfluidics. *Soft Matter* **8,** 10650–10657 (2012).

90. Straathof, A. J. J. Transformation of Biomass into Commodity Chemicals Using Enzymes or Cells. *Chem. Rev.* (2013).

91. Guerriero, G., Hausman, J.-F., Strauss, J., Ertan, H. & Siddiqui, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Eng. Life Sci.* n/a-n/a (2015). doi:10.1002/elsc.201400196

92. Himmel, M. E. *et al.* Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* **315,** 804–807 (2007).

93. Zhao, X., Zhang, L. & Liu, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **6,** 465–482 (2012).

94. Bayer, E. A., Belaich, J.-P., Shoham, Y. & Lamed, R. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58,** 521–554 (2004).

95. Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30,** 279–291 (2003).

96. Sun, S., Sun, S., Cao, X. & Sun, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199,** 49–58 (2016).

97. Li, L.-L., McCorkle, S. R., Monchy, S., Taghavi, S. & van der Lelie, D. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnol. Biofuels* **2,** 10 (2009).

98. Abot, A. *et al.* CAZyChip: dynamic assessment of exploration of glycoside hydrolases in microbial ecosystems. *BMC Genomics* **17,** (2016).

99. Paës, G., Berrin, J.-G. & Beaugrand, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* **30,** 564–592 (2012).

100. Cantarel, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37,** D233–D238 (2009).

101. Lee, Y.-J. *et al.* Purification and characterization of cellulase produced by Bacillus amyoliquefaciens DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* **99,** 378–386 (2008).

102. Vardakou, M. *et al.* Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. *J. Mol. Biol.* **375,** 1293–1305 (2008).

103. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382,** 769–781 (2004).

104. Vuong, T. V. & Master, E. R. Fusion of a Xylan-Binding Module to Gluco-Oligosaccharide Oxidase Increases Activity and Promotes Stable Immobilization. *PLoS ONE* **9,** e95170 (2014).

105. Reyes-Ortiz, V. *et al.* Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels* **6,** 93 (2013).

106. Hervé, C. *et al.* Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 15293–15298 (2010).

107. Kittur, F. S. *et al.* Fusion of family 2b carbohydrate-binding module increases the catalytic activity of a xylanase from Thermotoga maritima to soluble xylan. *FEBS Lett.* **549,** 147–151 (2003).

108. Hidayat, B. J., Felby, C., Johansen, K. S. & Thygesen, L. G. Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. *Cellulose* **19,** 1481–1493 (2012).

109. Zhang, X. *et al.* Understanding How the Complex Molecular Architecture of Mannan-degrading Hydrolases Contributes to Plant Cell Wall Degradation. *J. Biol. Chem.* **289,** 2002–2012 (2014).

110. Igarashi, K. *et al.* High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of Trichoderma reesei Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose. *J. Biol. Chem.* **284,** 36186–36190 (2009).

111. Nordgren, N., Eklöf, J., Zhou, Q., Brumer, H. & Rutland, M. W. Top-Down Grafting of Xyloglucan to Gold Monitored by QCM-D and AFM: Enzymatic Activity and Interactions with Cellulose. *Biomacromolecules* **9,** 942–948 (2008).

112. Penttilä, P. A. *et al.* Changes in Submicrometer Structure of Enzymatically Hydrolyzed Microcrystalline Cellulose. *Biomacromolecules* **11,** 1111–1117 (2010).

113. Kent, M. S. *et al.* Study of Enzymatic Digestion of Cellulose by Small Angle Neutron Scattering. *Biomacromolecules* **11,** 357–368 (2010).

114. Turon, X., Rojas, O. J. & Deinhammer, R. S. Enzymatic Kinetics of Cellulose Hydrolysis: A QCM-D Study. *Langmuir* **24,** 3880–3887 (2008).

115. Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L. & Cousin, F. Structural Details of Cellulose Nanocrystals/Polyelectrolytes Multilayers Probed by Neutron Reflectivity and AFM. *Langmuir* **24,** 3452–3458 (2008).

116. Elazzouzi-Hafraoui, S., Putaux, J.-L. & Heux, L. Self-assembling and Chiral Nematic Properties of Organophilic Cellulose Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **113,** 11069–11075 (2009).

117. Cerclier, C. *et al.* Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Adv. Mater.* **23,** 3791–3795 (2011).

118. Dammak, A. *et al.* Exploring Architecture of Xyloglucan Cellulose Nanocrystal Complexes through Enzyme Susceptibility at Different Adsorption Regimes. *Biomacromolecules* **16,** 589–596 (2015).

119. Cerclier, C. V. *et al.* Xyloglucan-Cellulose Nanocrystal Multilayered Films: Effect of Film Architecture on Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* (2013).

120. Paës, G. & Chabbert, B. Characterization of Arabinoxylan/Cellulose Nanocrystals Gels to Investigate Fluorescent Probes Mobility in Bioinspired Models of Plant Secondary Cell Wall. *Biomacromolecules* **13,** 206–214 (2012).

121. Paës, G. *et al.* Modeling Progression of Fluorescent Probes in Bioinspired Lignocellulosic Assemblies. *Biomacromolecules* **14,** 2196–2205 (2013).

122. Dumon, C., Song, L., Bozonnet, S., Fauré, R. & O'Donohue, M. J. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochem.* **47,** 346–357 (2012).

123. Kohnke, T., Ostlund, A. & Brelid, H. Adsorption of Arabinoxylan on Cellulosic Surfaces: Influence of Degree of Substitution and Substitution Pattern on Adsorption Characteristics. *Biomacromolecules* **12,** 2633–2641 (2011).

124. Bolam, D. N. *et al.* Evidence for Synergy between Family 2b Carbohydrate Binding Modules in Cellulomonas fimi Xylanase 11A. *Biochemistry (Mosc.)* **40,** 2468–2477 (2001).

125. Hoeger, I. C. *et al.* Bicomponent Lignocellulose Thin Films to Study the Role of Surface Lignin in Cellulolytic Reactions. *Biomacromolecules* **13,** 3228–3240 (2012).

126. Martin-Sampedro, R. *et al.* Preferential Adsorption and Activity of Monocomponent Cellulases on Lignocellulose Thin Films with Varying Lignin Content. *Biomacromolecules* **14,** 1231–1239 (2013).

127. Arcot, L. R., Lundahl, M., Rojas, O. J. & Laine, J. Asymmetric cellulose nanocrystals: thiolation of reducing end groups via NHS–EDC coupling. *Cellulose* **21,** 4209–4218 (2014).

128. McCleary, B. V. & McGeough, P. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4-β-Xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **177,** 1152–1163 (2015).

129. Du, R. *et al.* Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: SEC-MALLS analysis and reaction mechanism. *RSC Adv.* **3,** 1871–1877 (2013).

130. van der Kooij, H. M., Fokkink, R., van der Gucht, J. & Sprakel, J. Quantitative imaging of heterogeneous dynamics in drying and aging paints. *Sci. Rep.* **6,** (2016).

131. Muller, F. *et al.* Mechanism of Associations of Neutral Semiflexible Biopolymers in Water: The Xyloglucan Case Reveals Inherent Links. *Macromol. Chem. Phys.* **214,** 2312–2323 (2013).

132. Muller, F. *et al.* SANS Measurements of Semiflexible Xyloglucan Polysaccharide Chains in Water Reveal Their Self-Avoiding Statistics. *Biomacromolecules* **12,** 3330–3336 (2011).

133. de Gennes, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. (Cornell University Press, 1979).

134. Barakat, A., Putaux, J.-L., Saulnier, L., Chabbert, B. & Cathala, B. Characterization of Arabinoxylan−Dehydrogenation Polymer (Synthetic Lignin Polymer) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **8,** 1236–1245 (2007).

135. Barakat, A. *et al.* Supramolecular Organization of Heteroxylan-Dehydrogenation Polymers (Synthetic Lignin) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **9,** 487–493 (2008).

136. Barakat, A. *et al.* Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation. *Planta* **226,** 267–281 (2007).

Annexes

A Curriculum vitæ

B Autres produits de la recherche : séminaires, publications à diffusion restreinte

C Copie de 5 publications significatives

- C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009
- C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010
- C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012
- C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014
- C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016

Annexe A
Curriculum vitæ

Antoine BOUCHOUX

39 ans
Nationalité française
Pacsé, 2 enfants (6 et 8 ans)

Chargé de recherche 1ère classe
INRA, Institut National de la Recherche Agronomique
Département CEPIA, Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture

LISBP, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA
135 avenue de Rangueil
31077 Toulouse cedex 04, France
Tél. : 05.61.55.97.74 / Mob. : 06.10.88.65.66
Email : antoine.bouchoux@insa-toulouse.fr

Parcours universitaire

2001 **Diplôme d'Ingénieur des Industries Chimiques**, INPL, ENSIC, Nancy

2001 **Diplôme d'Etudes Approfondies en Génie des procédés**, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), Nancy

2004 **Doctorat de Génie des Procédés**, Université Paul Sabatier, Toulouse

Parcours professionnel

2005 **Séjour Postdoctoral. Belfort's Biomolecular Separations Research Group, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA**

Au cours de ce séjour, j'ai contribué à un vaste projet de recherche visant à mieux comprendre les phénomènes de translocation de protéines à travers le NPC (Nuclear Pore Complex), principal médiateur de transport entre le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes. Mon travail a consisté à mesurer par microscopie à force atomique (AFM) certaines des forces d'interactions protéines-protéines mises en jeu lors de cette translocation.

2006-2013 **Chargé de Recherche INRA. Laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO, UMR 1253 INRA-AGROCAMPUS OUEST), Rennes**
[Accueilli d'oct. 2011 à oct. 2013 au Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse]

L'objectif principal de mes recherches au STLO était de mieux comprendre les phénomènes de transfert impliqués dans la filtration d'un lait écrémé. J'ai pour cela développé une approche relevant de la physico-chimie et de la physique de la matière molle, visant à caractériser le comportement de la micelle de caséine - composé principal du lait - en cours de filtration et aux fortes concentrations : résistance à la compression, transition de phase, interactions. Au cours de cette période, j'ai également travaillé à l'élucidation de la structure de la micelle de caséine par des moyens physiques (rayons X, neutrons, AFM). J'ai aussi participé à des recherches visant à comprendre le comportement générique des protéines en milieu dense et confiné.

Oct. 2013 Chargé de recherche INRA. Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA), Toulouse

Le contexte général de mes recherches au LISBP est la valorisation de la biomasse lignocellulosique en composés à haute valeur ajoutée : carburant, synthons. Je m'intéresse aux procédés enzymatiques de dégradation de la biomasse, et cherche à mieux comprendre comment les enzymes dégradent leur substrat et en quoi l'efficacité de la dégradation est liée aux propriétés du substrat (composition, teneur en eau) et/ou celles de l'enzyme (structure, propriétés physico-chimiques). En lien avec des collègues physiciens et enzymologistes, je développe des approches expérimentales visant à "saisir l'enzyme au travail" dans des situations de fonctionnement réalistes, cad sur substrat naturel ou dans des situations modèles reproduisant une ou plusieurs caractéristique(s) d'un substrat complexe. De premiers travaux concernent par exemple le suivi de la dégradation enzymatique de films modèles d'une hémicellulose par microbalance à cristal de quartz (QCM). De façon parallèle, je continue de m'intéresser aux processus de filtration et de compression d'objets déformables et poreux, en rapport avec mes recherches antérieures. Je participe à ce titre au co-encadrement d'une thèse avec M. Meireles (LGC, Toulouse).

Production scientifique

16 publications dans des revues internationales à comité de lecture
3 publications dans des revues nationales à comité de lecture
27 communications orales dans des congrès et colloques internationaux (12) et nationaux (15)
23 posters dans des congrès et colloques internationaux (18) et nationaux (5)
Profils ResearcherID et Google Scholar :
http://www.researcherid.com/rid/E-9111-2010
http://scholar.google.fr/citations?user=B30sftYAAAAJ

Activités d'enseignement et d'encadrement

3 codirections de thèses
1 co-encadrement de séjour postdoctoral
Encadrement et co-encadrement de 14 stagiaires Master et Ingénieurs depuis 2006
Enseignement en Génie des Procédés : ≈ 70 heures TP en 2004

Autres activités et animations scientifiques

Membre du GDR CNRS 2980 "Approches Multi-physiques pour les systèmes Colloïdaux Concentrés" depuis 2008
Rapporteur pour des revues internationales dont Journal of Membrane Science (15), Separation & Purification Technology (4), Langmuir (2), Food Hydrocolloids (2), Pharmaceutical Research (1), Soft Matter (1), International Dairy Journal (1)
Responsable d'un équipement de microscopie à force atomique au STLO de nov. 2009 à oct. 2011
Co-organisateur des séminaires internes du LSIBP depuis janv. 2017
Co-fondateur du Club Lignocellulose en 2015 au LISBP
Responsable du thème *Milieux poreux et colloïdes* au sein de la fédération de recherche FERMaT (Fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts) sur Toulouse, depuis janv. 2017

Annexe B
Autres produits de la recherche[e]

Communications dans des congrès et colloques

- **Communication orales**
- **Posters**

Séminaires et autres communications orales

Produits et documents destinés à des utilisateurs de la recherche et/ou un public plus large

[e]Les articles publiés dans des revues à comité de lecture sont listés en partie 1.2

Communications dans des congrès et colloques

Communication orales

C27 *A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids: the Milk example*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou[f]
Euromembrane 2015, 06-10 sept. 2015, Aachen, DE

C26 *Understanding the behavior of deformable and porous microparticles in filtration: a microfluidic approach*
I. Bouhid de Aguiar, F. Lange, M. Meireles, **A. Bouchoux**
European Conference on Fluid-Particle Separation, 15-17 octobre 2014, Lyon, FR

C25 *Equations d'état de solutions hautement concentrées de lysozyme*
C. Pasquier, S. Pezennec, **A. Bouchoux**, B. Cabane, M. Lund, S. Rigault, S. Beaufils
6èmes Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 3-4 juin 2014, Le Mans, FR

C24 *In-Situ characterization by small angle x-ray scattering (SAXS) of accumulated layers during ultrafiltration of casein micelles dispersions*
G. Gésan-Guiziou, F. Pignon, C. David, **A. Bouchoux**, J. Perez
International Membrane Science & Technology Conference, 26-29 nov. 2013, Melbourne, AU

C23 *Modeling the filtration of soft and permeable colloids: the milk case study*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
14ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 8-10 oct. 2013, Lyon, FR

C22 *Modélisation de la filtration de colloïdes mous et déformables: Cas du lait*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
Colloque commun des sections Ouest du GFP (Groupement Français des Polymères) et de la SFGP (Société Française de Génie des Procédés), 15-17 mai 2013, Nantes, FR

C21 *Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions through Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP): From the dilute to the highly concentrated/crowded regime*
P. De Sa Peixoto, J. Floury, **A. Bouchoux**, M.-N.Madec, G.Gésan-Guiziou
6th International Symposium on Food Rheology and Structure, 10-13 avril 2012, Zurich, CH

C20 *Modeling the filtration of deformable and permeable colloidal particles: the case of casein micelles*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**
International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011, 23-29 juillet 2011, Amsterdam, NL

[f]Le nom de l'orateur est souligné

C19 *Casein micelle internal structure: a sponge model*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
5es Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR

C18 *Apport de la microscopie à force atomique (AFM) à l'étude d'un objet colloïdal naturel : la micelle de caséine*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
5es Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR

C17 *Compression osmotique de protéines globulaires : interactions aux concentrations élevées*
S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beaufils, S. Pézennec
5es Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR

C16 *What cohesive forces are involved in the gelation of casein micelle dispersions at high concentration?*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
Biopolymères' 2010, 1-3 déc. 2010, Le Croisic, FR

C15 *NMR water relaxation and self-diffusion in highly concentrated casein systems*
D. Schorr, M. Cambert, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou, F. Mariette
Biopolymères' 2010, 1-3 déc. 2010, Le Croisic, FR

C14 *Impact de la force ionique en filtration de lait : analyse des caractéristiques des micelles de caséines et des dépôts*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
12ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 14-16 oct. 2009, Marseille, FR

C13 *Ionic strength impact in filtration of skimmed milk: analysis of casein micelles and deposit properties*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
Euromembrane 2009, 6-10 sept. 2009, Montpellier, FR

C12 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gésan-Guiziou, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
5th International Symposium on Food Rheology and Structure, 15-18 juin 2009, Zurich, CH

C10 *Casein dispersions under osmotic stress: the impact of structure and mineral composition*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane
1st International Symposium on Minerals and Dairy Products, 1-3 oct. 2008, St-Malo, FR

C9 *Pressure effects in dead-end filtration of skimmed milk: Analysis of cake properties*
A. Bouchoux, F. Garnier, A. Haroun, G. Gésan-Guiziou
6th European Congress of Chemical Engineering, 16-20 sept. 2007, Copenhague, DK

C8 *Rôle de la composition ionique sur la rétention de sucres et d'acides organiques en nanofiltration: intensification des procédés*
H. Roux-de Balmann, B. Chaufer, B. Balannec, **A. Bouchoux**, M. Vourch
Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 13-14 mars 2006, Paris, FR

C7 *Key components for transport through the nuclear pore complex (Npc): mechanisms involved during binding between specific Karyopherins and Fg-Nups*
A. Dutta, **A. Bouchoux**, G. Belfort
2005 American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting, 30 oct. - 4 nov. 2005, Cincinnati, USA

C6 *Sélectivité de la nanofiltration pour l'intensification des procédés : mécanismes de rétention des sucres et des acides organiques*
B. Chaufer, H. Roux de Balmann, **A. Bouchoux**, O. Froidure-Lahrer, B. Balannec, M. Rabiller-Baudry
Colloque CIS INRA-CNRS Prosetia, 14-15 mars 2005, Villeneuve d'Ascq, FR

C5 *Introduction of nanofiltration in a production process of fermented organic acids*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
World Filtration Congress 9, 18-24 avril 2004, New Orleans, USA

C4 *Etude des mécanismes de sélectivité en nanofiltration en vue de l'intensification des procédés*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, M. Vourch, B. Balannec, B. Chaufer, G. Dorange, F. Lutin
Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 22-23 mars 2004, Toulouse, FR

C3 *Evaluation of nanofiltration for the purification of an organic acid fermentation broth*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
9th International Congress on Engineering and Food, 7-11 mars 2004, Montpellier, FR
Communication orale

C2 *Etude de la nanofiltration pour son introduction dans un procédé de production d'acides organiques*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 19-20 mars 2003, Rennes, FR

C1 *Intégration de la nanofiltration dans les procédés de production d'acides organiques alimentaires*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 19-20 mars 2002, Compiègne, FR

Posters

P23 *Membrane filtration of soft and permeable objects: the quest for general rules and guidelines*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Euromembrane 2015, 06-10 sept. 2015, Aachen, DE

P22 *Compressive behaviour of micrometer-sized methacrylated dextran microgels*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
5th International Colloids Conference, 21-24 juin 2015, Amsterdam, NL

P21 *How to quantify enzyme activity and kinetics in non-bulk systems? An example through the enzymatic hydrolysis of hemicellulose thin films*
A. Zeidi, L. Dianteill, C. Dumon, C. Montanier, R. Fauré, J. Morchain, N. Lebaz, C. Séverac, **A. Bouchoux**
The CBM11 - 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 10-13 mai 2015, Espoo, FI

P20 *Importance of water flux through protein interfacial films as revealed by neutron reflectometry on lysozyme and ovalbumin layers*
S. Pezennec, L.-T. Lee, **A. Bouchoux**, B. Cabane, C. Pasquier, M. Pasco, S. Beaufils
Neutrons and Food, 9-11 juillet 2014, Paris, FR

P19 *Extensive molecular trapping of non-sticky probes within casein microgels*
P. De Sa Peixoto, G. Gésan-Guiziou, D. Thomas, M. Schmutz, **A. Bouchoux**
International Soft Matter Conference 2013, 15-19 sept. 2013, Rome, IT

P18 *Dead-end filtration of sponge-like colloids: The case of casein micelle*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**
Euromembrane 2012, 23-27 sept. 2012, Londres, UK

P17 *Equation of state and structure of highly concentrated globular protein solutions*
C. C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, B. Cabane, S. Rigault, J. Perez, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, G. Paboeuf, M. Pasco, S. Pezennec
26th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2-7 sept. 2012, Lund, SE

P16 *Structure d'un colloïde naturel: la micelle de caséine du lait*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
Forum des Microscopies à Sonde Locale, 12-16 mars 2012, St-Jacut-de-la-Mer, FR

P15 *Modeling the filtration of deformable and permeable colloidal particles: the case of casein micelles*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
13ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 29 nov.-1 dec. 2011, Lille, FR

P14 *High-resolution imaging of milk casein micelles*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
AFM BioMed Conference, 23-27 août 2011, Paris, FR

P13 *On the determination of a critical osmotic pressure from the filtration of compressible soft colloids*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**
International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011, 23-29 juillet 2011, Amsterdam, NL

P12 *NMR water relaxation and self-diffusion in highly concentrated casein systems*
D. Schorr, M. Cambert, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou, F. Mariette
10th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science, 13-15 sept. 2010, Clermont-Ferrand, FR

P11 *Casein micelles as sticky colloidal microgel particles*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, B. Debbou, G. Gésan-Guiziou, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
24th Conference of the European Colloid and Interface Society, 5-10 sept. 2010, Prague, CZ

P10 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gésan-Guiziou, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
de Gennes Discussion Conference, 2-5 fév. 2009, Chamonix, FR

P9 *Osmotic Compression of Casein Micelle Dispersions*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane
Food Colloids 2008, 6-9 avril 2008, Le Mans, FR

P8 *Interactions between nucleoporins and karyopherins using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring with relevance to transport across the nuclear pore complex*
A. Dutta, J. Novatt, T. Jovanovic, **A. Bouchoux**, A.S. McKenney, M.P. Rout, B.T. Chait, G. Belfort
51st Annual Meeting of the Biophysical Society, 3-7 mars 2007, Baltimore, USA

P7 *Properties of accumulated matter in dead-end ultrafiltration of casein micelles solutions*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, A. Jimenez, C. Arcelin
2nd European Conference on Filtration and Separation, 12-13 oct. 2006, Compiègne, FR

P6 *Towards a better understanding of transport through nuclear pore complex: preparation and characterization of specific nucleoporins (FG-Nups) SAMs*
A. Bouchoux, A. Dutta, G. Belfort
230th American Chemical Society Annual Meeting, 28 août - 1er sept. 2005, Washington, USA

P5 *Effect of solute-solute interactions on nanofiltration selectivity*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
North American Membranes Society Annual Meeting 2005, 11-15 juin 2005, Providence, USA

P4 *Experimental approach of nanofiltration as a purification step in a production process of organic acids*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
4th European Congress of Chemical Engineering, 21-25 sept. 2003, Grenade, ES

P3 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
9ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 9-11 sept. 2003, St-Nazaire, FR

P2 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques reposant sur une étape d'électrodialyse à membranes bipolaires*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Colloque francophone MemPro2, 14-16 mai 2003, Montpellier, FR

P1 *Integration of nanofiltration in production processes of fermented organic acids*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
International Congress on Membranes and Membrane Processes 2002, 8-12 juillet 2002, Toulouse, FR

Séminaires et autres communications orales

S31 *Etude des cinétiques enzymatiques au niveau des interfaces et en milieu confiné : le cas de la biomasse lignocellulosique*
L. Dianteill, C. Dumon, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 14-15 nov. 2016, Banyuls-sur-Mer, FR

S30 *Diffusion de rayonnement aux petits angles (SAXS, SANS) : principe, instrumentation, applications*
A. Bouchoux
Séminaire interne du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 28 janv. 2016, Toulouse, FR

S29 *Interactions dans des films d'adsorption de protéines globulaires à l'interface eau-air: comportements différenciés et effets d'ions*
S. Pézennec, C. Pasquier, S. Beaufils, L.-T. Lee, **A. Bouchoux**, V. Lechevalier, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR

S28 *Equations d'état expérimentales du lysozyme*
C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pézennec
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR

S27 *Compressive behavior of polydisperse suspensions of permeable and deformable microgels*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR

S26 *Synthesis and characterization of deformable and porous microparticles*
I. Bouhid de Aguiar, F. Lange, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 19-21 oct. 2014, Carcans, FR

S25 *Micelle de caséine, SANS, et variation de contraste*
A. Bouchoux, J. Ventureira, F. Lambrouin, G. Gésan-Guiziou,P. Qu, C. Pasquier, S. Pézennec, R. Schweins, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR

S24 *Equation d'état et structure de solutions de protéines globulaires hautement concentrés*
C. Pasquier, S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beaufils, S. Pézennec, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR

S23 *Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions*
P. De Sa Peixoto, **A. Bouchoux**, J. Floury, M.-N. Madec, G. Gésan-Guiziou
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR

S22 *Assemblages protéiques colloïdaux sous compression osmotique : interactions, structuration, et procédés*
A. Bouchoux
Séminaire interne du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 19 janv. 2012, Toulouse, FR

S21 *Assemblages protéiques colloïdaux sous compression osmotique : interactions, structuration, et procédés*
A. Bouchoux
Séminaire interne du Laboratoire de Génie Chimique, 12 janv. 2012, Toulouse, FR

S20 *Modélisation de la filtration de colloïdes déformables et perméables : cas des micelles de caséine*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
Journées du GDR 2980 AMC2, 13-14 oct. 2011, Toulouse, FR

S19 *Compression osmotique de protéines globulaires: interactions aux concentrations élevées*
S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beaufils, S. Pezennec
Journées du GDR 2980 AMC2, 13-14 oct. 2011, Toulouse, FR

S18 *Regonflement de gels de micelles de caséine*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
Journées du GDR 2980 AMC2, 12-14 décembre 2010, Annecy, FR

S17 *Structure de la micelle de caséine sous compression osmotique*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 12-14 décembre 2010, Annecy, FR

S16 *Structure de la micelle de caséine : nouvelle proposition*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
Séminaire interne du laboratoire STLO, 29 nov.2010, Rennes, FR

S15 *AFM et agroalimentaire*
V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
Journées Microscopie Champ Proche Bretagne, 28-29 juin 2010, Rennes, FR

S14 *Microscopie à force atomique à l'INRA de Rennes : appareillage et premiers développements*
A. Bouchoux, F. Guyomarc'h
Journées Microscopie Champ Proche Bretagne, 28-29 juin 2010, Rennes, FR

S13 *Microscopie à force atomique*
A. Bouchoux, F. Guyomarc'h, G. Jan
Séminaire interne du laboratoire STLO, 05 fév.2010, Rennes, FR

S12 *Caractérisation par SAXS des profils de concentration de micelles à la surface des membranes lors de la filtration de lait*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, F. Pignon, C. David, J. Perez
Journée INRA-SOLEIL, 13 nov. 2009, Gif sur Yvette, FR

S11 *La micelle de caséine sous compression osmotique: structure, interactions, rhéologie*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P-E. Cayemitte, B. Debbou, J. Jardin, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
Journées du GDR 2980 Prosurf, 06-07 juillet 2009, Sorèze, FR

S10 *La micelle de caséine sous compression osmotique: structure, interactions, rhéologie*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P-E. Cayemitte, B. Debbou, J. Jardin, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
Journée projet ANR ECOPROM "Mécanismes et Modélisation / Filtration / Protéines laitières", 29 juin 2009, Rennes, FR

S9 *Pression osmotique de dispersions de micelle : stress osmotique et séchage par désorption*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P. Schuck, B.Cabane
Journée du GDR 2980 Prosurf, 17 oct. 2008, Toulouse, FR

S8 *La micelle de caséine sous stress osmotique: 3 régimes de compression*
A. Bouchoux, B. Cabane, P-E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou
Journées du GDR 2980 ProSurf, 19-20 juin 2008, Carry-le-Rouet, FR

S7 *Mesures de forces par AFM: principe et exemples*
A. Bouchoux
Journée transversalité INRA SFBA (Séparation des Fluides Biologiques et Alimentaires), 19 déc. 2006, Paris, FR

S6 *Ultra- et Microfiltration d'un lait écrémé : de la détermination des interactions micellaires à la modélisation globale de l'opération*
A. Bouchoux
Séminaire interne du laboratoire STLO, 9 oct. 2006, Rennes, FR

S5 *Modélisation du colmatage lors de la filtration d'un lait : réflexions et approches appropriées*
A. Bouchoux
Journée du Club Français des Membranes "Théorie et modélisation du transport transmembranaire", 14 juin 2006, Besançon, FR

S4 *Membranes biologique / synthétique et sélectivité: deux exemples*
A. Bouchoux
Séminaire interne du laboratoire STLO, 17 fév. 2006, Rennes, FR

S3 *Integration of nanofiltration in a production process of fermented organic acids - Theoretical considerations and experimental results*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
Eurodia technical meeting, 28-30 janv. 2004, Wissous, FR

S2 *Introduction of nanofiltration in a production process of organic acids*
A. Bouchoux
5th Network of Young Membrains, 2-3 oct. 2003, Barcelone, ES

S1 *Integration of nanofiltration in production processes of fermented organic acids*
A. Bouchoux
4th Network of Young Membrains, 5-7 juillet 2002, Toulouse, FR

Produits et documents destinés à des utilisateurs de la recherche et/ou un public plus large
(Liens fonctionnels au 28 février 2017)

L11 **2013** - Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA
Structure d'un colloïde naturel : la micelle de caséine du lait
http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/micelles
http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237437-0197c-resource-recherches-et-innovations-edition-2013.html

L10 **2012** - Plaquette Soleil / INRA "INRA en lumière : 5 ans de partenariat avec Soleil
Structure de la micelle de caséine : une nouvelle proposition
http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/226391-52870-resource-5-ans-de-partenariat-avec-soleil-edition-2012.html

L9 **2012** - Site web STLO
Les macromolécules du lait au synchrotron SOLEIL
http://www4.rennes.inra.fr/stlo/Toutes-les-actualites/Les-macromolecules-du-lait-au-synchrotron-SOLEIL

L8 **2011** - Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA
Structure de la micelle de caséine : de son élaboration à son organisation interne
http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/structure-micelle
http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237439-a26da-resource-recherches-et-innovations-edition-2011.html

L7 **2010** - Site web STLO
Milk casein micelles investigated as soft matter
http://www6.rennes.inra.fr/stlo/Main-results/Dairy-Processing/TIPIL-R4

L6 **2010** - Lettre "En direct des laboratoires" de l'institut INSIS du CNRS.
Structure et comportement de la micelle de caséine en milieu dense
http://www.cnrs.fr/insis/recherche/direct-labos/2010/micelle-de-caseine-milieu-dense.htm

L5 **2010 -** Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA.
Comportement des micelles de caséine lors de la filtration du lait
http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/caseine-filtration
http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237440-2b9a4-resource-recherches-et-innovations-edition-2010.html

L4 **2009 -** Plaquette faits marquants du centre INRA de Rennes.
Comportement des micelles de caséine lors des opérations de filtration du lait
http://www.rennes.inra.fr/content/download/8224/127296 (lien expiré)

L3 **2009** - Plaquette INRA CEPIA "Understanding biomolecules assemblies with rheology"
Casein micelles in dense dispersions: interactions and phase behaviour

http://www.cepia.inra.fr/Outils-et-Ressources/Editions/rheologie/%28key%29/6
http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237340-423a6-resource-understanding-biomolecule-assemblies-with-rheology.html

L2 **2009 -** Rapport annuel INRA
Comportement des micelles de caséine lors des opérations de filtration du lait
http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/230748-7e33f-resource-rapport-d-activite-2009.html

L1 **2008** - Plaquette INRA CEPIA "Des recherches en génie des procédés"
Comportement des micelles de caséine en milieu concentré
http://www.cepia.inra.fr/Outils-et-Ressources/Editions/genie-des-procedes/%28key%29/4
http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237332-9064b-resource-des-recherches-en-genie-des-procedes.html

Annexe C
Copie de 5 publications significatives

C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009
C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010
C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012
C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014
C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016